

**DAS VERHALTEN VON
3-DESOXY-D-GALAKTOSE
IM STOFFWECHSEL DER RATTE**

Stephan Gruber

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DAS VERHALTEN VON 3-DESOXY-D-GALAKTOSE IM STOFFWECHSEL DER RATTE

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Stephan Gruber

aus München

1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Theimer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 1978



Die vorliegende Arbeit wurde in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München in der Zeit von Januar bis Juni 1972 und von März 1973 bis Mai 1976 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz gebührt mein Dank für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz, seine wertvollen Ratschläge und für sein Interesse, das er stets der Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Dr. G. Nowoczek gilt mein besonderer Dank für viele hilfreiche Diskussionen über Versuchsplanung und Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. B. Linzen danke ich herzlich für die großzügige Förderung und Unterstützung der Arbeit und anregende Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B) ÜBERSICHT UND ERGEBNISSE DER VERSUCHE	5
I) Dauerverfütterung von 3-Desoxy-D-galaktose an junge Ratten während der Myelinisierung	5
1) Allgemeine Beobachtungen	7
2) Gewichtsentwicklung	8
3) Histologische Befunde	9
4) Lipidchemische Untersuchungen	10
a) Lipide der FOLCH-Unterphasen	11
b) Gangliosidfraktion der FOLCH-Oberphasen	13
5) Blut - Urin - Faeces	14
II) Einmalige Gabe tritiummarkierter 3-Desoxy-D- galaktose	14
1) Verteilung der Radioaktivität im Organismus	15
a) Vergleich von intraperitonealer und intra- cerebraler Injektion	15
b) Zeitlicher Verlauf der Radioaktivitäts- verteilung auf verschiedene Organe nach intraperitonealer Injektion (Pharmako- kinetik)	16
2) Verteilung der Radioaktivität innerhalb der (Leber)-Zelle	19
a) Veranschaulichung nach der Methode von DE DUVE	19
b) Versuche zur Charakterisierung der lös- lichen radioaktiven Substanzen im Cytosol	21
3) Markierte Metabolite	25
a) Mit Chloroform/Methanol extrahierbare Substanzen	25
b) Substanzen im Extraktionsrückstand (der Leber)	30
c) Übersicht über die Ergebnisse der Isotopen- versuche	30

III) Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Strukturermittlung des Stoffwechselproduktes Desoxy-Dulcitol	31
1) Dünnschichtchromatographie	32
2) Dünnschichtelektrophorese	32
3) Hydrolyseversuche	33
4) Säulenchromatographische Isolierung	33
5) Gaschromatographie	33
6) Massenspektrum	35
7) Synthese	38
8) Spektrum der kernmagnetischen Resonanz	39
IV) Enzymatische Untersuchungen mit 3-Desoxy-D- galaktose	39
1) Galaktokinase aus Hefe	39
2) Hexokinase aus Hefe	42
C) DISKUSSION	43
D) EXPERIMENTELLER TEIL	48
1) Versuchstiere	48
2) Chemikalien, Substrate, Enzyme	48
3) Dünnschicht- und Radiodünnschichtchromatographie	49
4) Gas- und Radiogaschromatographie	52

Die folgende Einteilung bezieht sich auf die Kapitel des Hauptteils.

Zu I) Dauerverfütterung von 3-Desoxy-D-galaktose an junge Ratten während der Myelinisierung	53
1) Tierexperimentelles	53
3) Histologische Technik	54
4) Lipidchemische Untersuchungen	55
1. Herstellung von Gesamtlipidextrakten	55
2. "FOLCH-Verteilung"	56

a) Lipide der FOLCH-Unterphasen	56
1. Säulenchromatographische Auftrennung gangliosidfreier Gehirnlipidextrakte	56
2. Hydrolyse dreier isolierter Lipide mit Salzsäure	57
3. Dünnschicht- und gaschromatographische Analyse der Zuckerbestandteile	58
5) Blut - Urin - Faeces	58
 Zu II) Einmalige Gabe tritiummarkierter 3-Desoxy-D- galaktose	 59
1) Verteilung der Radioaktivität im Organismus	59
1. Tierexperimentelles	59
2. Injektionen	59
3. Flüssigkeitsszintillationsmessung der Radio- aktivität	60
2) Verteilung der Radioaktivität innerhalb der (Leber)-Zelle	61
a) Veranschaulichung nach der Methode von DE DUVE	61
1. Gewebefraktionierung	61
2. Proteinbestimmung	62
b) Versuche zur Charakterisierung der löslichen radioaktiven Substanzen des Cytosols	62
1. Fällungsreaktionen mit Trichloressigsäure und Cetylpyridiniumchlorid	62
2. Dialyse der Zellunterfraktionen	62
3. Versuch einer Molekulargewichtsbestimmung	63
4. Hydrolyse der löslichen Fraktion (Cytosol) mit Salzsäure	64
5. Synthese von 3-Desoxy-D-galaktonolacton	65
3) Markierte Metabolite	66
b) Substanzen im Extraktionsrückstand (der Leber)	66
1. Dialyse	66
2. Hydrolyse des Dialysates mit Salzsäure	66

Zu III) Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Strukturermittlung des Stoffwechselproduktes Desoxy-Dulcit	66
2) Dünnschichtelektrophorese	66
3) Hydrolyse mit Salzsäure	67
4) Säulenchromatographische Isolierung	67
5) Gaschromatographie	69
7) Synthese von 3-Desoxy-D-dulcit	69
Zu IV) Enzymatische Untersuchungen mit 3-Desoxy-D- galaktose	71
1) Galaktokinase aus Hefe	71
2) Hexokinase aus Hefe	73
E) ZUSAMMENFASSUNG	74
F) LITERATURVERZEICHNIS	76
G) LEBENS LAUF	80

ABKÜRZUNGEN:

abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CpM	gezählte Impulse pro Minute (counts per minute)
DpM	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
FID	Flammenionisationsdetektor
MG	Molekulargewicht
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
UDP	Uridindiphosphat

Nomenklatur der Ganglioside nach SVENNERHOLM (90):

Gangliosid:	Kurzbezeichnung (87):
G _{M1}	Monosialo-N-tetraglycosylceramid
G _{M2}	Monosialo-N-triglycosylceramid
G _{D1a} } G _{D1b} }	Disialo-N-tetraglycosylceramid
G _{T1}	Trisialo-N-tetraglycosylceramid

Zu den rationellen Namen vgl. (91), zur chemischen Struktur s. (87).

A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In verschiedenen galaktosehaltigen Sphingolipiden des Gehirns ist die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 der Galaktose eine der bevorzugten Stellen weiterer Substitution. Es sei hier vor allem auf die Sulfatide und Ganglioside hingewiesen, in denen die 3-Stellung des Zuckers mit Schwefelsäure verestert ist (1,2) bzw. glycosidisch gebundene N-Acylneuraminsäure trägt (3) (Abb. 1).

Beide Verbindungsklassen können auf Grund erblicher Defekte der abbauenden Enzyme im Organismus angehäuft werden. Die dadurch verursachten, tödlich verlaufenden Erkrankungen (4) werden nach Art der gespeicherten Substanz, des Enzymdefekts und nach ihren Entdeckern als Sulfatidosen (metachromatische Leucodystrophie, Typ SCHOLZ) (5,6) oder Gangliosidosen (GM_1 -Gangliosidose¹⁾) (7, 8,9), TAY-SACHS'sche Erkrankung (10,11,12) und SANDHOFF'sche Erkrankung (13,14)) bezeichnet.

Das Seminolipid, ein im Hoden vorkommendes Glycerolipid, trägt analog den Sulfatiden in der 3-Stellung der Galaktose eine Schwefelsäureestergruppierung (15) und auch die Strukturen der Oligosaccharide der Frauenmilch weisen häufig Verknüpfungen in der 3-Stellung der Galaktosereste auf. Es ist aus diesen Gründen von großem Interesse, das Stoffwechselverhalten des entsprechenden Zuckers mit blockierter 3-Stellung, also der 3-Desoxy-D-xylo-hexose (3-Desoxy-D-galaktose, im Folgenden kurz 3-Desoxygalaktose genannt) zu untersuchen. Würde dieser Zucker beispielsweise an Ceramid zu einem Desoxy-Cerebrosid geknüpft, so müßten Störungen der Sulfatid-Biosynthese die Folge sein, würde er in Ceramid-Oligosaccharide eingebaut, so würde die Anheftung von Neuraminsäure blockiert und dementsprechend die Gangliosid-Biosynthese behindert werden.

Im Gegensatz zu ihrem käuflichen Analogon 2-Desoxygalaktose (16,17) ist die 3-Desoxygalaktose toxikologisch und pharmako-

¹⁾ Nomenklatur der Ganglioside nach SVENNERHOLM (90), s. auch unter Abkürzungen.

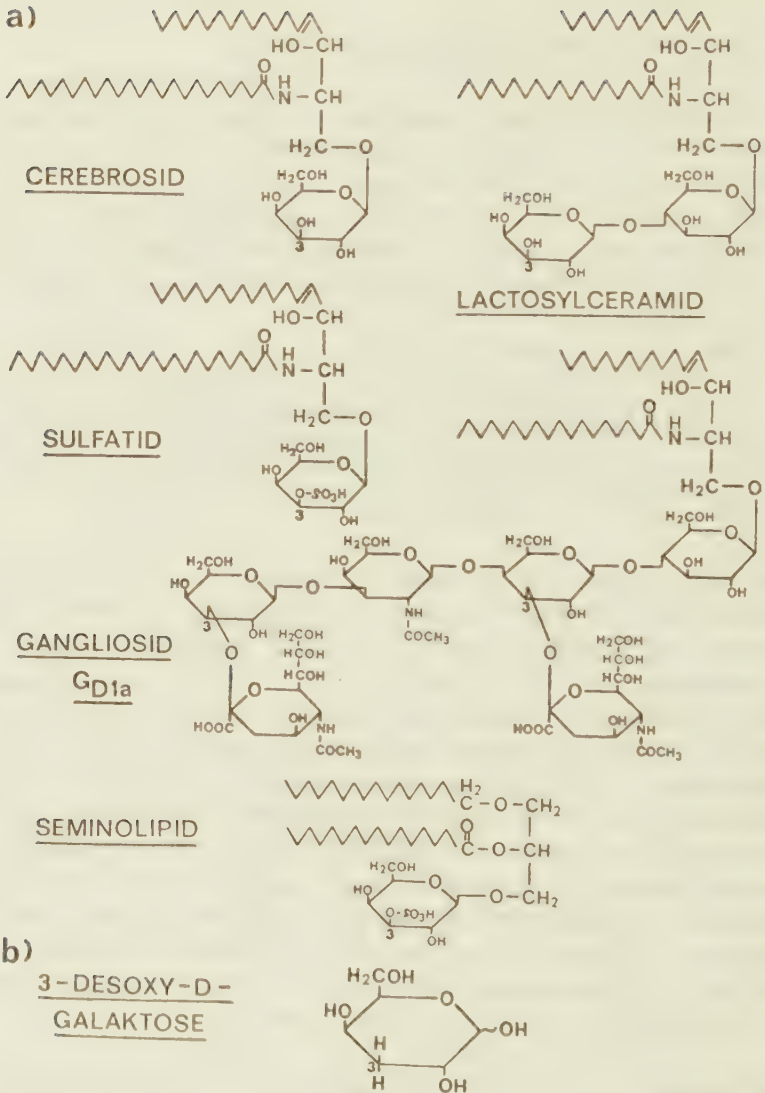


Abb. 1. a) Galaktosehaltige Lipide; b) 3-Desoxy-D-galaktose
Die substituierte 3-Stellung des Zuckers ist durch die Ziffer 3 gekennzeichnet.

logisch bisher nicht untersucht worden. Lediglich im Rahmen einer in-vitro-Untersuchung über den aktiven Transport von Zuckern durch die Wand des Hamsterdarms wurde neben vielen anderen Substanzen auch 3-Desoxygalaktose untersucht (18). Sie wird nicht aktiv transportiert.

Als Testsubstanz fand 3-Desoxygalaktose noch in einer Studie über den Transport und Stoffwechsel von 2-Desoxygalaktose in Nierenrindenschnitten aus Kaninchen neben einer Reihe anderer strukturell ähnlicher Zucker zur Überprüfung der Spezifität des Transportsystems Verwendung (19).

Manche Mikroorganismen können die Substanz jedoch anscheinend in ihren Stoffwechsel einbeziehen. Aus *Pseudomonas*-stämmen konnten Dehydrogenasen isoliert werden, die in der Lage sind, 3-Desoxygalaktose zu dehydrieren. So fanden WALLENFELS und KURZ (20), daß die von DeLEY und DOUDOROFF (21) erstmals beschriebene NAD⁺-abhängige Galaktose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas saccharophila* auch 3-Desoxygalaktose mit etwa der halben Geschwindigkeit des eigentlichen Substrats zu dehydrieren vermag. Dieser Befund wurde bei der eingehenden Untersuchung dieses Enzyms durch WENGENMAYER et al. (22) bestätigt. SCHIWARA und DOMAGK (23) reichernten aus einem Stamm von *Pseudomonas putida* eine konstitutive, NADP⁺-abhängige Dehydrogenase an, die von ihnen Abequose-Dehydrogenase genannt wurde. Neben der in den immunrelevanten Lipopolysacchariden der Mikroorganismen vorkommenden Abequose (3-Desoxy-D-fucose, 3,6-Didesoxy-D-galaktose) (24) vermag dieses Enzym, 3,6-Didesoxy-D-galaktose: NADP-Oxidoreduktase, auch 3-Desoxygalaktose zu dehydrieren. Als Produkt entsteht daraus 3-Desoxy-D-galaktonsäure.

Auf Grund der Unkenntnis des Verhaltens der 3-Desoxygalaktose im Säugerstoffwechsel, z.B. ihrer Toxizität, mußten zunächst grundlegende Versuche über die Wirkung der Substanz, wie Fütterungsversuche gemacht werden. Die Substanz dafür wurde nach der Methode von WEYGAND und WOLZ (25) hergestellt. Durch entsprechende Modifizierung dieser Synthese läßt sich 3-Desoxygalaktose in den Positionen 3 und 4 mit Tritium markieren (26), so daß auch die Pharmakokinetik der Verbindung oder ihrer Folgeprodukte geprüft werden kann. Da das Hauptinteresse der Arbeit eventuellen Veränderungen der Gehirnlipide gilt, werden als Versuchstiere junge, in der Myelinisierungsperiode befindliche Ratten gewählt.

Dauerfütterungsversuche mit unmarkierter 3-Desoxygalaktose und zeitlicher Gang der Radioaktivitätsverteilung nach einmaliger Applikation der markierten Substanz werden im ersten und zweiten Abschnitt dieser Arbeit beschrieben. Der dritte Abschnitt beschäftigt sich mit der Isolierung und chemischen Charakterisierung eines Metaboliten der Verbindung und im letzten Abschnitt wird geprüft, inwieweit der Desoxy-Zucker als Substrat des Galaktose-aktivierenden Enzyms, der Galaktokinase dienen kann.

B) ÜBERSICHT UND ERGEBNISSE DER VERSUCHE

I) Dauerverfütterung von 3-Desoxy-D-galaktose an junge Ratten während der Myelinisierung

Zu Beginn des Versuchs wurden ohne Rücksicht auf das Geschlecht der Tiere 4 Gruppen zu je 6 sechzehntägigen Sprague-Dawley-Ratten aus verschiedenen Würfen gebildet, um zufällige Besonderheiten eines Wurfs möglichst auszuschließen. Drei davon dienten als Kontroll-, die vierte als Versuchsgruppe. Sie wurden wie folgt ernährt (s. auch Tab. 1):

Gruppe I verblieb bei einer Mutter und erhielt überdies Standard-Preßfutter ad libitum.

Die Gruppen II-IV erhielten MBF Gerber (27), eine zur Ernährung galaktosämischer Kinder hergestellte, galaktosefreie Diät-nahrung. Das Produkt, das eine cremeartige Konsistenz aufweist (26 % Trockensubstanz), wurde mit Wasser bis zum Trockensubstanzgehalt der Rattenmilch (17,5 %) (28) verdünnt. Es wurde dadurch flüssig und von den Jungtieren nach einem kurzen Lernprozeß aus Trinkflaschen gerne angenommen. Dieser Nahrung wurden die in Tab. 1 angeführten Zusätze beigemischt. Wasser erhielten alle Gruppen ad libitum.

Tab. 1. Ernährungsbedingungen für 24 junge Sprague-Dawley-Ratten, zusammengefaßt in drei Vergleichsgruppen und eine Versuchsgruppe.

Die Basisnahrung der Gruppen II-IV enthielt 17,5 % Trockensubstanz und wurde durch Vermischen von 105 g MBF Gerber (26 % Trockensubstanz) mit 51 g Wasser hergestellt. ^{a)}Die Tiere der Gruppe II erhielten an den beiden ersten Tagen des ersten Versuchs D-Galaktose, später D-Lactose; Details im Text.

Gruppe	Anzahl der Tiere	Ernährung pro Tag	Zusätze
I	6 (+1)	Muttermilch, Preßfutter, Wasser	-- (Muttertier)
II	6	156 g MBF Gerber, Wasser	4,75 g (14 mMol) Lactose (2,5 g Galaktose) ^{a)}
III	6	156 g MBF Gerber, Wasser	--
IV	6	156 g MBF Gerber, Wasser	2,3 g (14 mMol) 3-Desoxygalaktose

Aus den in Tab. 1 gemachten Angaben folgt, daß in der Versuchsgruppe (IV) je Tier und Tag durchschnittlich 383,3 mg (2,34 mMol) 3-Desoxygalaktose in 26 g Nahrungsgemisch angeboten wurde. Diese Menge wurde bis zum 19. Lebenstag nicht ganz, ab dann aber vollständig verbraucht, so daß man davon ausgehen kann, daß - abgesehen von Gruppe I - vom 20. Lebenstag an die angebotene Nahrungsmenge für die Gewichtsentwicklung der Tiere in den Gruppen II-IV limitierend war.

Nimmt man die sich aus Abb. 2a und b ergebenden Durchschnittsgewichte der Tiere hinzu, so folgt weiter, daß am 20. Lebenstag eine Dosis von durchschnittlich 10 g 3-Desoxygalaktose pro kg Ratte appliziert wurde.

Da die pro Tag verabreichte Menge konstant blieb, das Gewicht der Tiere aber zunahm, verringerte sich diese Gewichts-dosis bis auf die Hälfte am Ende des Versuchs. Der gewählte Zeitraum, vom 16. bis 30. Lebenstag schließt die Hauptmyelinisierungsperiode

der Tiere ein (29). Sie wurden während dieser Zeit täglich zur gleichen Uhrzeit gewogen, nach der letzten Wägung getötet und die Organe Gehirn, Leber, Nieren und Magen entnommen. Der Versuch wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Gewichtskurven sind in den Abb. 2a und b wiedergegeben.

1) Allgemeine Beobachtungen

Verhaltensunterschiede waren zwischen der Versuchsgruppe und den Kontrollgruppen nicht feststellbar. Die Tiere der Gruppen II-IV zeigten eine etwas größere Lebhaftigkeit als die der Gruppe I.

Das Fell der Ratten der Gruppen II-IV war auf Grund der fehlenden mütterlichen Pflege in den ersten Versuchstagen struppig und unansehnlich. Mit fortschreitendem Alter trat aber eine weitgehende Besserung ein, die zu einer fast vollständigen Normalisierung des Fellzustandes führte.

Der Kot der Tiere der Versuchsgruppe IV war dünner und klebriger als bei den Vergleichsgruppen. In den letzten 5-6 Versuchstagen wurde die Konsistenz der Faeces jedoch zunehmend fester.

Die Wasseraufnahme der Tiere in Gruppe IV war gegenüber der der Gruppen II und III um etwa 10 % niedriger. Sie war in Gruppe I erwartungsgemäß am höchsten, die Gruppen II und III wiesen in dieser Hinsicht keinen Unterschied auf.

Ursprünglich bestand die Absicht, den Tieren der Gruppe II die der in Gruppe IV applizierten 3-Desoxygalaktose äquimolare Menge ($14 \text{ mMol} = 2,5 \text{ g}$) D-Galaktose zu verabreichen. Bereits am 2. Versuchstag (17. Lebenstag) stellten sich jedoch starke Vergiftungserscheinungen ein. Die Tiere zeigten ein äußerst auffälliges Verhalten: Völlige Apathie wechselte mit Zittern und anfallsartigen Sprüngen zur Käfigdecke. Gleichzeitig trat innerhalb eines Tages ein starker etwa 12 % betragender Gewichtsverlust ein. Dieses Bild deckt sich weitgehend mit der in der Literatur beschriebenen Symptomatik einer D-Galaktose-Intoxikation (30,31). Neurochemisch ist der Zustand durch Abfall von Glucose, Glycogen, glycolytischen Zwischenprodukten und der Glycolyserate gekennzeichnet und die Gehirnwerte für Adenosintriphosphat und

Kreatinphosphat sind dementsprechend um 10-20 % erniedrigt (30). Um den Energiestoffwechsel zu verbessern, wurde der Nahrung der Tiere als Sofortmaßnahme eine der D-Galaktose äquivalente Menge D-Glucose zugesetzt (32). Vom folgenden 3. Versuchstag (18. Lebenstag) an erhielten sie die äquimolare Menge D-Lactose. Die Tiere erholten sich daraufhin rasch. Im zweiten Versuch wurde der Gruppe II von Anfang an D-Lactose verfüttert. Es traten weder Vergiftungserscheinungen noch Gewichtsverluste auf.

Je 2 Tiere der Gruppen II und IV litten während des ersten Fütterungsversuches an Trübungen des Auges. Obwohl der kataraktogene Effekt von D-Galaktose und D-Lactose in der Literatur beschrieben ist (33), dürfte es sich hier eher um eine bei Nagern gelegentlich vorkommende, durch infektiöse Keratitis bedingte Hornhauttrübung (34) gehandelt haben, da der Befund im zweiten Versuch nicht auftrat.

2) Gewichtsentwicklung

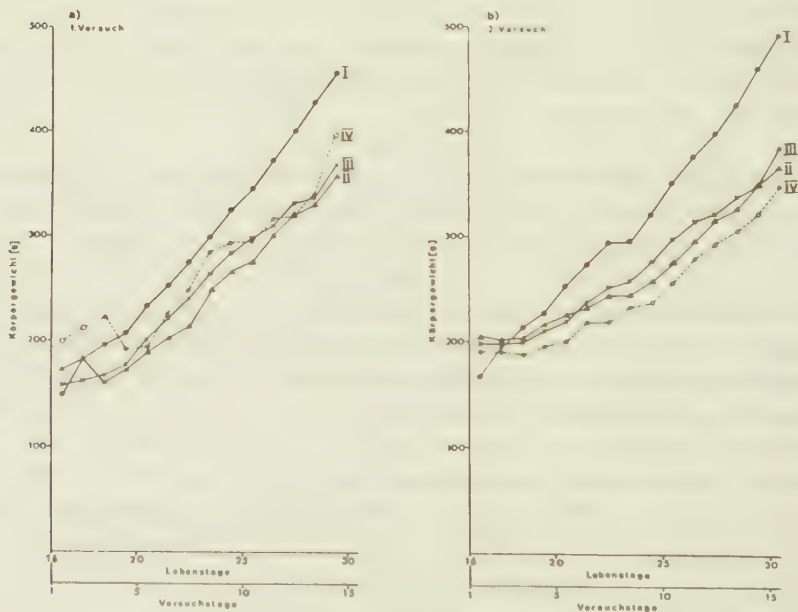


Abb. 2. Gewichtsentwicklung der Tiergruppen unter den in Tab. 1 angegebenen Ernährungsbedingungen in zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen.
a) Erster Versuch; b) Zweiter Versuch

Abszisse: Lebensalter der Tiere bzw. Versuchsdauer in Tagen
Ordinate: Gesamtgewicht der Gruppen zu je sechs Tieren in Gramm

Die Gewichtszunahme der Tiere der Gruppe I verlief in beiden Versuchen fast linear. Demgegenüber war der Anstieg der Gruppen II-IV etwas verlangsamt, aber im Ganzen gesehen stetig. Abgesehen von dem vorher erwähnten Gewichtsverlust der Gruppe II durch eine Galaktose-Intoxikation am Anfang des ersten Versuchs war keine der aus den Kurven ersichtlichen Unregelmäßigkeiten mit einer erkennbaren Ursache erklärbar. Auch der starke ca. 14%ige Gewichtsverlust der Versuchsgruppe IV am vierten Versuchstag (19. Lebenstag), der zunächst eine toxische Wirkung der 3-Desoxygalaktose anzudeuten schien, setzte sich nicht weiter fort und war auch in der Wiederholung des Versuchs nicht reproduzierbar. Das gleiche gilt auch für die Zunahmeverzögerungen, die im ersten Versuch zwischen 4. und 5. bzw. 8. und 10. Versuchstag und im zweiten Versuch zwischen 6. und 9. Versuchstag in verschiedenen Gruppen auftraten.

3) Histologische Befunde

Je ein Tier aus jeder Gruppe wurde durch Perfusion mit (4%iger) Formalinlösung getötet und Gehirn, Leber, Milz und Magen in Formalin fixiert.

Auffallend war bei den Tieren der Versuchsgruppe IV der aufgeblähte, 5 cm lange und fast 10 g schwere Magen. Dieser Befund wurde bei allen Tieren der Gruppe IV, aber nicht in den Vergleichsgruppen beobachtet. Die histologische Untersuchung¹⁾ ergab eine hochgradig atrophische Magenwand, die durch eine Schädigung der Mucosa und der Drüsenzellen, sowie eine Verschmälerung der Muskelschicht gekennzeichnet war. Weder makroskopischer noch mikroskopischer Befund waren jedoch im zweiten Versuch reproduzierbar.

Die histologischen Befunde von Gehirn, Leber und Milz zeigten keine pathologischen Veränderungen der Versuchsgruppe gegenüber den Vergleichsgruppen.

1) Die Anfertigung der histologischen Präparate und ihre Interpretation verdanke ich den Herren Dr. G.W. Kreutzberg und Dr. P. Mehraein und ihren Mitarbeitern von der Forschungsabteilung Neuropathologie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie.

4) Lipidchemische Untersuchungen

Von den jeweils vereinigten Gehirnen, Lebern, Nieren und Mägen der übrigen fünf Tiere jeder Gruppe wurden durch Extraktion mit Chloroform/Methanol (2:1) Gesamtlipidextrakte gewonnen und durch Entmischen des Extrakts mit Wasser einer "FOLCH-Verteilung" (35) unterworfen.

Wie in einem Vorversuch unter Verwendung von radioaktiv markierter 3-Desoxygalaktose geklärt wurde, würde die Ausgangssubstanz bei dieser Art der Extraktion miterfaßt. Dazu wurden den Homogenaten von Gehirn und Leber, sowie dem nach Gefriertrocknung hergestellten Trockenpulver von Niere je 0,5 μCi (82 ng) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] in 0,1 ml wäßriger Lösung zugesetzt und das Material anschließend mit Chloroform/Methanol extrahiert; im Falle von Gehirn und Leber durch Homogenisieren und anschließende Filtration, im Falle des Nierentrockenpulvers durch Heißeextraktion. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2. Extrahierbarkeit von 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] aus Gewebshomogenaten mit Chloroform/Methanol.

	zugegeben 0,5 μCi	Gehirn	Leber	Niere
Extrakt	100 %	83,8 %	80,4 %	43,6 %
Rückstand		1,7 %	2,6 %	26,0 %

Der prozentuale Anteil des extrahierten Gesamtlipids am Trockengewicht wurde für Gehirn und Leber bestimmt und war in diesen Organen für alle Gruppen etwa gleich. Die erhaltenen Werte (Tab. 3) stimmen recht genau mit denen der Literatur (36) überein.

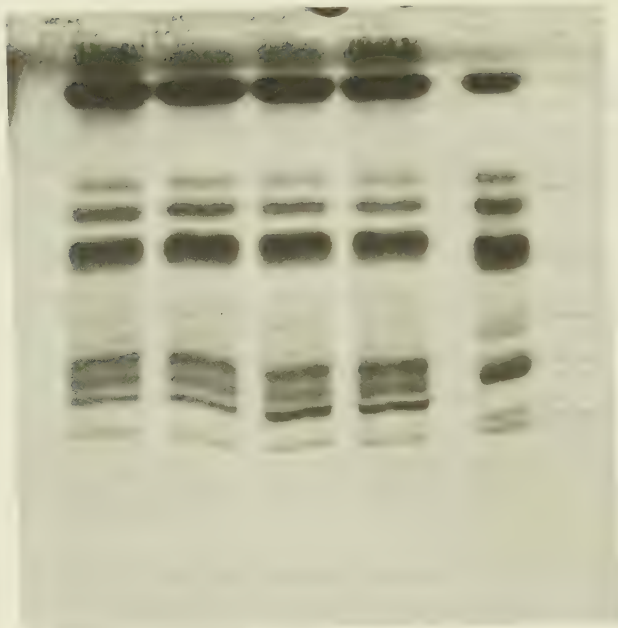
Tab. 3. Prozentuale Gesamtlipidanteile an der Trockensubstanz von Gehirn und Leber in den einzelnen Versuchsgruppen.

Das Gesamtlipid wurde durch Wägung nach Eindampfen der Extrakte und Trocknung des Rückstandes im Vakuum, das Trockengewicht der Organe nach Gefriertrocknung bestimmt.

Gruppe	Anteil des Gesamtlipids an der Trockensubstanz in %	
	Gehirn	Leber
I	41,7	17,6
II	40,6	18,2
III	40,9	18,2
IV	40,5	19,1

a) Lipide der FOLCH-Unterphasen

In Gehirn, Leber, Niere und Magen konnten dünnschichtchromatographisch (Laufmittelsysteme I und II, s. Abschnitt D 3) außer geringen Variationen im Triglycerid- und Cholesterinesteranteil der visceralen Organe keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede in den sich entsprechenden Lipidmustern der verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 3).



Gr. I II III IV Lipid-Testgemisch

Abb. 3. Dünnschichtchromatogramm der FOLCH-Unterphasen der aus den vier Gruppen erhaltenen Gehirnlipidextrakte im Laufmittelsystem I (s. Abschnitt D 3, S. 49).

Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Eisessig nach KAGI-MIESCHER (37).

Insbesondere wurde in den Extrakten der Gruppe IV auf Verbindungen geachtet, die sich dünnschichtchromatographisch (Laufmittelsystem I, s. Abschnitt D 3) in der Region zwischen Cerebrosiden und Cholesterin darstellen. Cerebrosidanalogue mit 3-Desoxygalaktose anstelle von D-Galaktose als Zuckeranteil sollten dort zu finden sein. Um solche, in Abb. 3 nicht beobachtete, möglicherweise aber nur in Spuren vorhandenen Substanzen zu erfassen, wurden die Gehirnlipide der FOLCH-Unterphasen aus den Tieren der Gruppen I und IV säulenchromatographisch aufgetrennt und die entsprechenden Fraktionen erneut geprüft. Dabei konnten drei Verbindungen (zwei davon als Doppelfleck) in der Unterphase der Gruppe IV, nicht dagegen in der entsprechenden Präparation der Gruppe I gefunden werden. Sie wurden sauer hydrolysiert. Als Spaltprodukt trat jedoch jeweils nur D-Galaktose, keine 3-Desoxygalaktose auf, so daß es sich wahrscheinlich um Galaktolipide handelte, die im Gehirn normalerweise, aber nur in sehr geringen Mengen vorkommen, wie etwa Monogalaktosyldiglycerid.- Übereinstimmend damit war nach Applikation tritiummarkierter 3-Desoxygalaktose in der Region zwischen Cerebrosiden und Cholesterin radiodünnschichtchromatographisch keine Aktivität nachweisbar (s.u.).

b) Gangliosidfraction der FOLCH-Oberphasen

In der hydrophilen Phase der Gehirnlipidextrakte der Gruppe IV fand sich eine zusätzliche in den Extrakten der Vergleichsgruppen nicht vorhandene Substanz, die dünnschichtchromatographisch (Laufmittelsystem III, s. Abschnitt D 3) knapp oberhalb des Gangliosids G_{M1} wanderte, nicht den Gangliosiden zugeordnet werden konnte, aber auch keine 3-Desoxygalaktose war (Abb. 4). Die Verbindung wurde von Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach KÄGI-MIESCHER (37) grauviolett angefärbt und war in den Extrakten von Leber, Niere und Magen nicht nachweisbar.

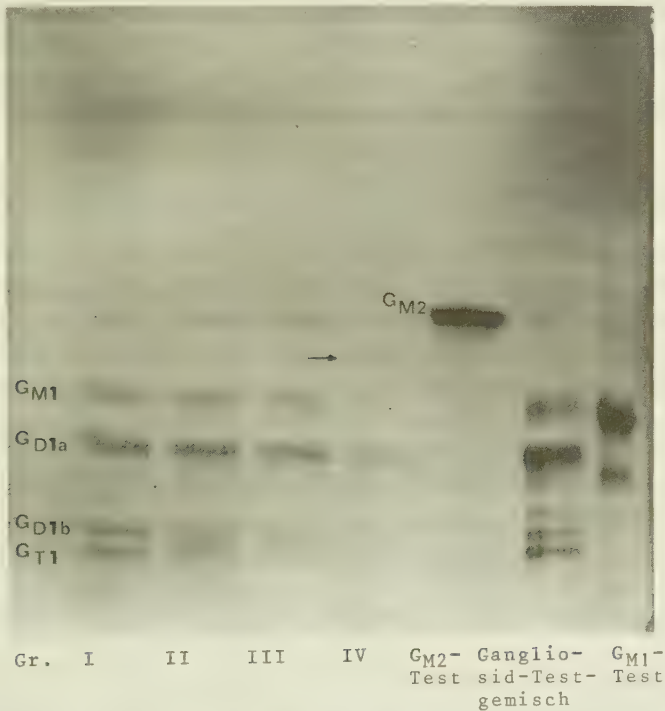


Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm der FOLCH-Oberphasen der aus den vier Gruppen erhaltenen Gehirnlipidextrakte im Laufmittelsystem III (s. Abschnitt D 3, S. 49).

Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Eisessig nach KÄGI-MIESCHER (37). Die oberhalb des Gangliosids G_{M1} wandernde zusätzliche Substanz in Gruppe IV ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nomenklatur der Ganglioside nach SVENNERHOLM (90), s. auch unter Abkürzungen.

In Tab. 4 sind die R_f -Werte dieser Substanz (im Folgenden als Substanz X bezeichnet) und zum Vergleich die der 3-Desoxygalaktose selbst in fünf Laufmittelsystemen wiedergegeben.

Tab. 4. R_f -Werte von Substanz X und 3-Desoxygalaktose bei Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten in den Laufmittelsystemen III, IV, VI, VII und IX (Details und Verzeichnis der Laufmittelsysteme s. Abschnitt D 3, S. 49).

Laufmittelsystem	R_f -Werte	
	Substanz X	3-Desoxygalaktose
III	0,30	0,41
IV	0,36	0,46
VI	0,63	0,70
VII	0,46	0,55
IX	0,16	0,32

5) Blut - Urin - Faeces

In Blut, Urin oder Faeces der Gruppe IV vom letzten Versuchstag ließen sich 3-Desoxygalaktose oder die vorerwähnte Substanz X nicht nachweisen.

II) Einmalige Gabe tritiummarkierter 3-Desoxy-D-galaktose

Im Gegensatz zur Dauerverfütterung größerer Mengen einer Verbindung, welche die toxischen und pharmakologischen Wirkungen einer Substanz sichtbar werden läßt, wird die einmalige Gabe einer verhältnismäßig kleinen Menge dazu benützt, um den dynamischen Prozeß, der der Applikation einer Substanz im Organismus folgt - Aufnahme in den Kreislauf, Verteilung auf die verschiedenen Organe und Gewebe, Wechselwirkung mit diesen, Stoffwechsel und

schließliche Ausscheidung - in seinem zeitlichen Verlauf zu verfolgen. Dies wird methodisch besonders einfach, wenn es gelingt, die Substanz mit einem Radionuclid zu markieren.

1) Verteilung der Radioaktivität im Organismus

Für sich gibt eine solche, durch Differentialmessung der Radioaktivität nach verschiedenen Zeiten erhaltene Pharmakokinetik noch keinen besonders genauen Einblick in die wahren Vorgänge, da sie alle Stoffwechselumsetzungen der etikettierten Verbindung, wie z.B. Redoxreaktionen, Bindung an oder Einbau in hochmolekulare Substanzen, Übertragung des Radionuclids auf andere Moleküle u.a.m. außer Betracht läßt, sie liefert aber dann eine brauchbare Übersicht des Geschehens, wenn das gewonnene Bild durch zusätzliche analytische Untersuchungen ergänzt wird.

a) Vergleich von intraperitonealer und intracerebraler Injektion

Im vorliegenden Fall wurde die 3-Desoxygalaktose, um unübersehbare Einflüsse - wie etwa die der Darmflora - auszuschließen, parenteral appliziert, obwohl die Kleinheit, elektrische Neutralität und leichte Wasserlöslichkeit der Zuckermoleküle eine schnelle Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt erwarten ließen. Die gleichen Gründe lassen auch eine Permeation der Substanz durch die Blut-Liquor-Schranke erwarten. Um dies zu prüfen, wurden zunächst die sich nach intraperitonealer und intracerebraler Applikation der tritiummarkierten Verbindung ergebenden pharmakokinetischen Kurven im Hinblick auf die erzielte Markierung des Gehirns verglichen.

Vierzehn Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 15 Tagen wurden in 2 Gruppen zu je 7 Tieren mit je einem Muttertier zusammengefaßt und ad libitum ernährt. Zu Beginn des Versuches wurden jedem der Jungtiere 20,74 μCi (3,4 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] intraperitoneal bzw. intracerebral injiziert (s. Abschnitt D II 1.2.). Dies entspricht einer Gewichts-dosis von 691 μCi (113 μg) je kg Ratte. Nach 2, 6 und 24 Stunden, 5, 9, 14 und 21 Tagen wurde

aus jeder Gruppe je ein Tier getötet und Gehirn, Leber, Nieren, Magen, Dünndarm, Lungen und Blut entnommen. Die Radioaktivität der Proben wurde wegen der unterschiedlichen Färbung der Materialien und der dadurch bedingten Schwankungen in der Zählzählbeute mit Hilfe einer zugefügten tritiummarkierten Standardsubstanz im Szintillationszähler auf absolute Aktivität korrigiert und auf das Feuchtgewicht bezogen. Die sich ergebenden Zeitkurven der spezifischen Aktivität in Blut und verschiedenen Organen sind in Abb. 5a und b wiedergegeben.

Man erkennt, daß die spezifische Radioaktivität des Gehirns nach intracerebraler Injektion zunächst naturgemäß sehr hoch ist, dann aber innerhalb eines Tages bis in einen Bereich absinkt, der andererseits in derselben Zeit auch nach intraperitonealer Applikation erreicht, ja sogar übertroffen wird. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche zur Pharmakokinetik der 3-Desoxygalaktose die auch technisch einfachere intraperitoneale Applikationsweise gewählt. Nächst dem empfangenden Organ - im Falle der intracerebralen Injektion dem Gehirn - weist die Niere die höchste Aktivität auf, eine Folge der leichten Wasserlöslichkeit der 3-Desoxygalaktose. Es fällt auf, daß die Aktivität dieses Organs 2 Stunden nach intracerebraler Injektion der Substanz etwa doppelt so hoch ist wie nach intraperitonealer und die Aktivität der Leber 2 Stunden nach intraperitonealer Applikation das 4,6fache des nach intracerebraler Applikation erreichten Wertes beträgt.

b) Zeitlicher Verlauf der Radioaktivitätsverteilung auf verschiedene Organe nach intraperitonealer Injektion (Pharmakokinetik)

Achtzig sechzehntägigen Ratten wurden zu Beginn des Versuchs je 20,97 μCi (50 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] d.s. 713 μCi (1,7 mg) je kg Ratte intraperitoneal injiziert. Zu den aus Abb. 6 ablesbaren Zeiten wurden je fünf Tiere getötet und Blut sowie Gehirn, Leber, Nieren und Magen entnommen. Wie vorher wurde die gemessene Radioaktivität jeder Probe auf mg Feuchtgewicht bezogen. Der zeitliche Verlauf der Mittelwerte der spezifischen

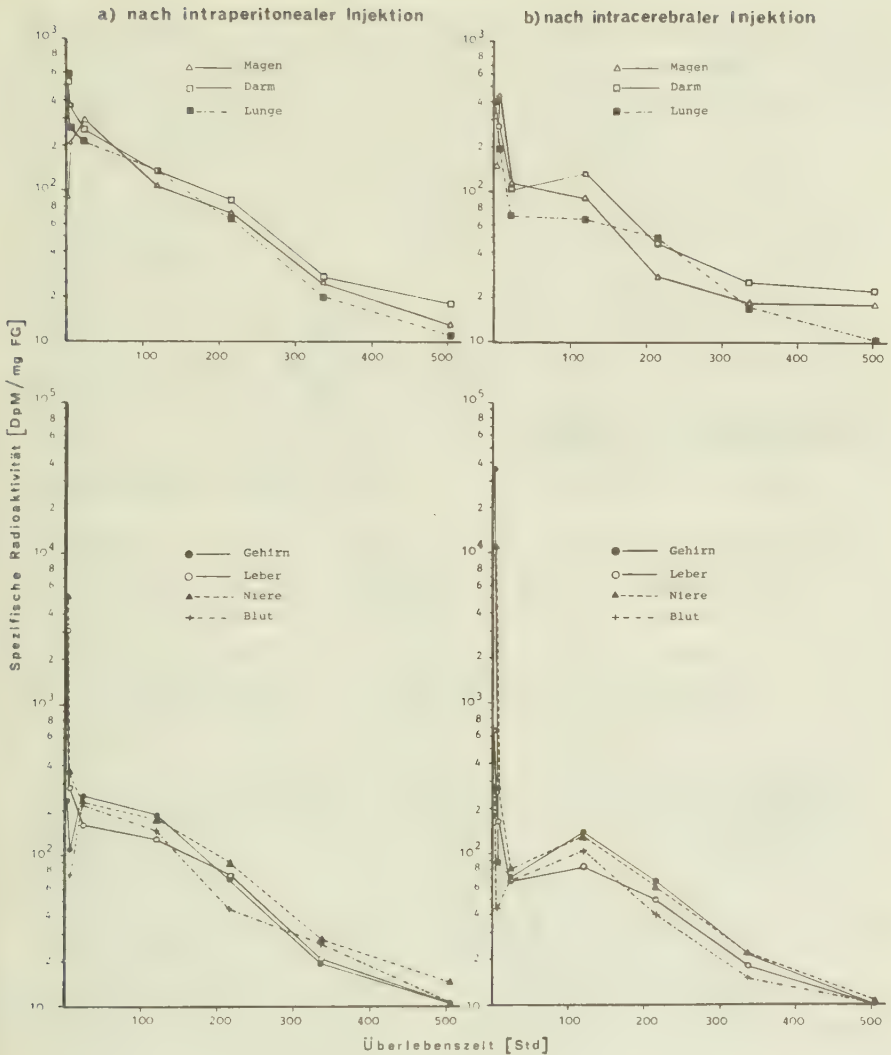


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der spezifischen Radioaktivität in Blut und verschiedenen Organen der Ratte nach Applikation von 20,74 μCi (3,4 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] in halblogarithmischer Darstellung.
 a) nach intraperitonealer Injektion
 b) nach intracerebraler Injektion

Abszisse: Überlebenszeit der Tiere in Stunden
 Ordinate: Spezifische Radioaktivität in DpM pro mg Feuchtgewicht

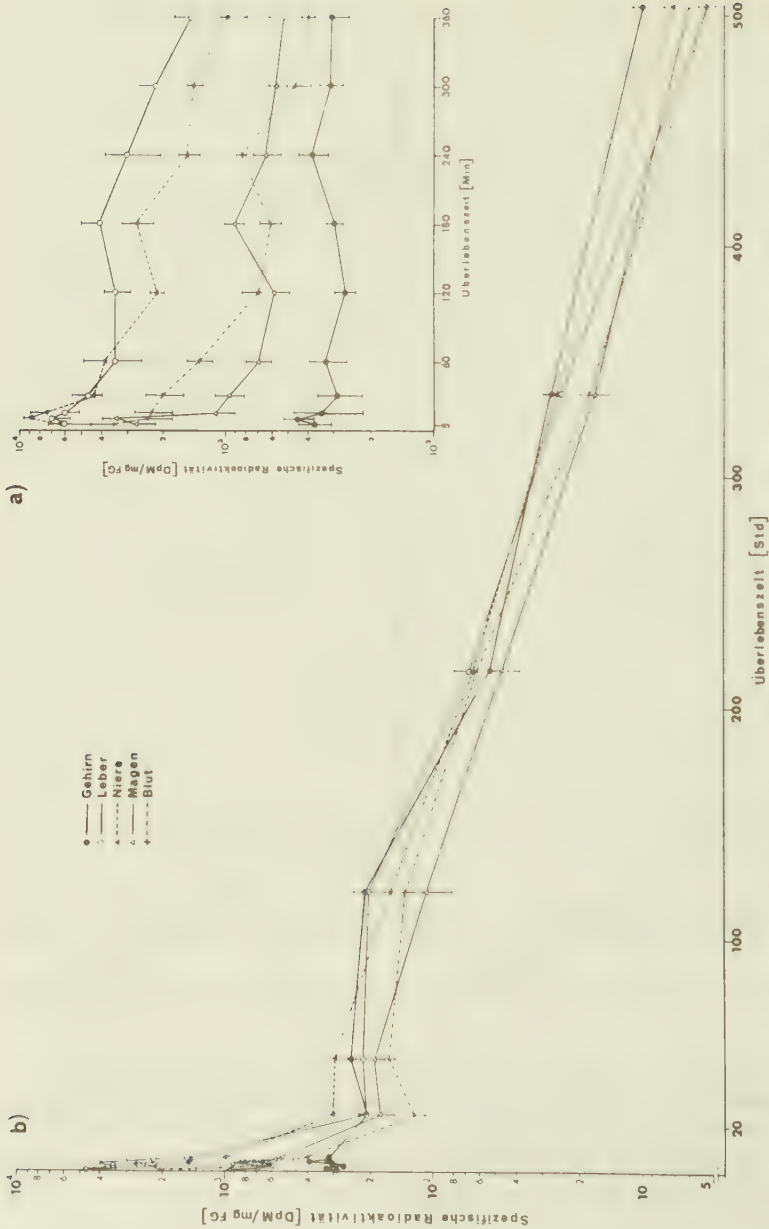


Abb. 6. Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) des zeitlichen Verlaufs der spezifischen Radioaktivität in Blut und verschiedenen Organen der Ratte nach Applikation von 20,97 μCi (50 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] in halblogarithmischer Darstellung.

a) Verlauf während der ersten 6 Stunden; b) Verlauf während der gesamten Versuchsdauer

Abszisse: Überlebenszeit der Tiere in Minuten bzw. Stunden

Ordinate: Spezifische Radioaktivität in DPM pro mg Feuchtgewicht

Radioaktivität in den untersuchten Geweben ist, zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen, in den Abb. 6a und b wiedergegeben. Abb. 6a zeigt den Verlauf während der ersten sechs Stunden, Abb. 6b während der gesamten Versuchsdauer.

Zeitlich gesehen zeigt in Abb. 6b die spezifische Radioaktivität, wiewohl während des ersten Tages im Niveau verschieden, in den untersuchten Organen einen analogen Verlauf. Nach einem sehr raschen Anstieg wird - abgesehen vom Blut - bereits nach etwa 10 Minuten der Spitzenwert erreicht, um dann in drei deutlich unterscheidbaren Neigungen wieder abzunehmen: In den ersten 30 Minuten fällt die spezifische Aktivität beinahe ebenso schnell wieder ab, wie sie vorher anstieg. Der zweite Abschnitt mittlerer Steilheit dauert etwa 24 Stunden lang.

Der kleine Zwischengipfel bei 3 Stunden (Leber, Niere und Magen) bzw. 4 Stunden (Blut und Gehirn) tritt zwar in allen Geweben auf, fällt aber fast in die Fehlergrenzen der Bestimmungen und ist deshalb vermutlich nicht signifikant.

Vom 24-Stunden-Wert an sinkt die spezifische Radioaktivität in allen untersuchten Materialien gleichförmig in absoluter Höhe und Neigung über die restlichen 20 Tage der Versuchsdauer weiter ab. Im Blut wird der Spitzenwert erwartungsgemäß noch schneller erreicht als in den Organen, vermutlich noch vor 5 Minuten nach der Applikation. Die absoluten Werte der spezifischen Radioaktivität sind, wie aus Abb. 6a leicht zu erkennen ist, in den ersten 6 Stunden sehr verschieden. Die höchsten Werte weisen Niere und Leber auf, gefolgt von Magen und Blut, dessen Sonderstellung als verteilendes Medium durch den sehr frühen Spitzenwert angedeutet ist. Mit dem niedrigsten Spitzenwert, aber auch dem langsamsten Abfall zeigt die spezifische Aktivität des Gehirns den ausgeglichensten Gang von allen untersuchten Organen.

2) Verteilung der Radioaktivität innerhalb der (Leber)-Zelle

a) Veranschaulichung nach der Methode von DE DUVE

Acht achtzehntägigen Ratten wurden je 147 μCi (1,5 mg) d.s. 4,89 mCi (50 mg) je kg 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] intraperitoneal appliziert. Nach einer Stunde Überlebenszeit ohne Futtergabe wur-

den die Tiere getötet, die Lebern entnommen und vereinigt. Durch Differentialzentrifugation nach DE DUVE et al. (38), modifiziert nach SAWANT et al. (39), wurden die vier Haupt-Zellunterfraktionen Kerne (N), Mitochondrien (M), Mikrosomen (P) und Cytosol (S) gewonnen und in aliquoten Teilen Protein-gehalt und Radioaktivität bestimmt.

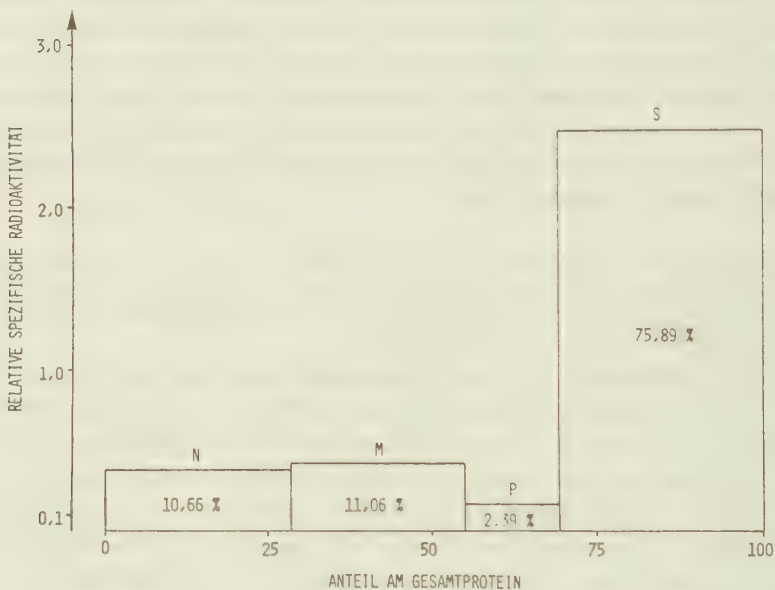


Abb. 7. DE DUVE-Diagramm der subzellulären Radioaktivitätsverteilung in der Rattenleber 1 Stunde nach intraperitonealer Injektion von 147 μCi (1,5 mg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] je Tier.

Abszisse: Prozentualer Anteil der Fraktion am Gesamtprotein
 Ordinate: Relative spezifische Aktivität (prozentualer Anteil der Fraktion an der Radioaktivität/prozentualer Anteil der Fraktion am Gesamtprotein)
 Die Zahlen in den Säulen geben den prozentualen Anteil der Radioaktivität wieder.

Die Ergebnisse sind in Abb. 7 nach der Methode von DE DUVE (38) in Form eines Histogramms dargestellt. Diese Darstellungsweise läßt in den Flächenrelationen der Säulen die Verteilung der Gesamtaktivität erkennen, während ihre Höhe ein Maß für die Spezifität der Verteilung zugunsten der jeweiligen Fraktion gibt. Im vorliegenden Fall fand sich die radioaktive Substanz zu ca. 76 % im Überstand.

Aus den partikulären Fraktionen wanderte die Radioaktivität bei wiederholter Resuspension und Zentrifugation allmählich in die Überstände bzw. bei Dialyse in das Dialysat (s.u.). Ein qualitativer Vergleich dieser Substanzen mit denen im Cytosol war jedoch wegen der geringen Mengen nicht möglich.

b) Versuche zur Charakterisierung der löslichen radioaktiven Substanzen im Cytosol

Um zunächst zu prüfen, ob die radioaktive Substanz vielleicht in höhermolekulare Verbindungen wie Proteine (Glyco-Seitenketten) oder saure Polysaccharide eingebaut wurde, wurden diese Substanzklassen mit Trichloressigsäure bzw. Cetylpyridiniumchlorid (40) gefällt und die Verteilung der Radioaktivität auf Niederschlag und Überstand gemessen. Tab. 5 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 5. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität des Cytosols der Ratten-Leberzelle 1 Stunde nach intraperitonealer Applikation von 147 μCi (1,5 mg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] auf Niederschlag und Überstand nach Fällung mit Trichloressigsäure bzw. Cetylpyridiniumchlorid.

	Trichloressigsäure Endkonz. 40,7 %	Cetylpyridiniumchlorid Endkonz. 4,2 %
Überstand	97,8 %	98,1 %
Niederschlag	2,2 %	1,9 %
S u m m e	100,0 %	100,0 %

Die Radioaktivität verblieb beinahe vollständig im Überstand.

Ähnliche Ergebnisse brachte die Dialyse bei einer Durchlässigkeitsgrenze der verwendeten Schläuche von ca. 15 000 Dalton. Es wurden alle Fraktionen der Differentialzentrifugation geprüft und man erkennt aus Tab. 6, daß die Aktivität aus allen, auch den unlöslichen Partikelfractionen, fast vollständig in das Dialysat (1 l destilliertes Wasser) auswanderte. Adsorption durch das Schlauchmaterial fand nicht statt.

Tab. 6. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität der subzellulären Fraktionen der Ratten-Leberzelle bei der Dialyse eine Stunde nach intraperitonealer Applikation von 147 μ Ci (1,5 mg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- 3 H].

	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Cytosol
Dialysat	99,2 %	98,9 %	97,1 %	99,8 %
Rückstand	0,7 %	0,5 %	2,6 %	0,1 %
Schlauch	0,1 %	0,6 %	0,3 %	0,1 %
S u m m e	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Wenn daher überhaupt ein Einbau der 3-Desoxygalaktose oder eines ihrer Metaboliten in höhermolekulare Einheiten stattfindet, dann muß deren Molekulargewicht kleiner als 15 000 sein. Um dies näher zu prüfen, wurde das Dialysat des Cytosols gefriergetrocknet und der Rückstand radiodünnschichtchromatographisch geprüft. In dem hierzu benutzten Laufmittelsystem IV (s. Abschnitt D 3) würden 3-Desoxygalaktose bzw. die als mögliches Stoffwechselprodukt angesehene Substanz X wie in Tab. 4 auf S. 14 dargelegt R_f -Werte von 0,46 bzw. 0,36 aufweisen. Nach dem Lauf war jedoch nur am Start Radioaktivität nachweisbar.

Dazu ist zu bemerken, daß die für diesen Versuch zur Verfügung stehende Gesamt-Aktivität nicht sehr groß war (ca. 60 000 DpM), die Zählhausbeute des Dünnschichtscanners für Tritium nur etwa 3 % beträgt, und das Cytosol von der vorangegangenen Zellfraktionierung her noch erhebliche Mengen Saccharose enthielt, so daß kleine Mengen aktiver Substanzen von der Saccharose, deren Substanzgipfel von R_f 0,05 bis R_f 0,27 reichte, wahrscheinlich retardiert und überdeckt worden wären.

Abgesehen von diesen erwarteten, aber radiodünnschichtchromatographisch hier nicht erfaßten Substanzen, deutete die am Start der Dünnschichtplatte verbliebene Radioaktivität auf einen Einbau der 3-Desoxygalaktose oder eines radioaktiven Metaboliten in größere Moleküle hin. Das Cytosol wurde daher mit Hilfe der nach der Molekülgröße auftrennenden Methode der Gelfiltration untersucht. Da die Substanzen möglicherweise Kohlenhydrate sein konnten, wurde als Träger das auf Polyacrylamidbasis hergestellte Biogel P2 benutzt, das nach den Angaben des Herstellers (s. Abschnitt D II 2b 3.) im Molekulargewichtsbereich von 100-3000 auftrennen sollte. Als Testsubstanzen wurden ebenfalls Kohlenhydrate, nämlich Glucose (MG 180), Maltose (342), Maltotriose (504), Maltotetraose (666), Maltopentaose (829), Maltohexaose (991) und Dextranblau ($2 \cdot 10^6$) verwendet. Die Ergebnisse dieser Gelchromatographie sind in dem Diagramm der Abb. 8 dargestellt.

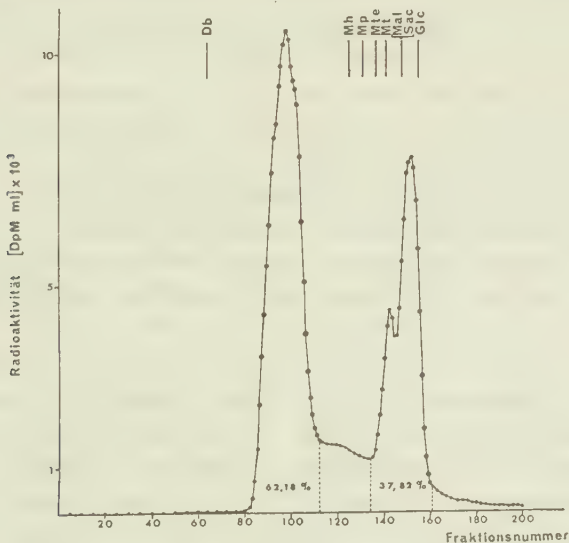


Abb. 8. Radioaktivitätsverteilung in den 1 ml-Fractionen einer Gelchromatographie (Säule 1,5 x 98,4 cm; Säulenvolumen 174 ml) des Cytosols an Biogel P2.

Abszisse: Fraktionsnummer

Ordinate: Radioaktivität in DpM/ml x 10³

Die Schwerpunkte der verwendeten Eichsubstanzen im Eluat sind eingezeichnet. Db: Dextranblau; Mh: Maltohexaose; Mp: Maltopentaose; Mte: Maltotetraose; Mt: Maltotriose; Mal: Maltose; Sac: Saccharose; Glc: Glucose.

Die Radioaktivität erschien im wesentlichen in zwei Gipfeln, von denen der erste 62 % der Aktivität enthielt und ein Molekulargewicht von etwa 2000 aufwies (s. Abb. 16 im Abschnitt D II 2b 3.). Der zweite war mit einem Molekulargewicht von ungefähr 200 niedermolekular (s. Abb. 16) und umfaßte 38 % der Radioaktivität.

Die zu jedem der beiden Gipfel gehörenden Fraktionen wurden vereinigt, zur Trockene gebracht und wie vorher geschildert im Laufmittelsystem IV dünnschichtchromatographisch untersucht. Die höhermolekular gebundene Radioaktivität des ersten Gipfels blieb dabei am Start liegen, die des niedermolekularen (der wie vorher die Saccharose enthielt) war nach dem Lauf nicht mehr nachweisbar.

Wurde der durch Gefriertrocknung erhaltene Trockenrückstand des Cytosols der salzsauren Hydrolyse unterworfen, so ergab die anschließende Dünnschichtchromatographie der entstandenen Produkte im Laufmittelsystem IV einen mit $R_f = 0,55$ wandernden Radioaktivitätsgipfel, der nach Rückgewinnung und Rechromatographie einen R_f -Wert von 0,18 besaß.

Diese im Zuge der Reinigung aufgetretene starke Änderung des dünnschichtchromatographischen Verhaltens deutete auf eine während dieser relativ schonenden Operationen stattgefundene Umlagerung hin, die an die Öffnung eines Lactonringes denken ließ.

Tatsächlich wurden bei der chemischen Oxidation von 3-Desoxygalaktose mit Bromwasser oder bei ihrer biologischen Dehydrierung mit Galaktose-Dehydrogenase (aus *Pseudomonas fluorescens*) und NAD^+ Substanzen mit entsprechenden R_f -Werten gebildet. In beiden Fällen wurde eine elektrisch neutrale Verbindung mit $R_f = 0,55$ (Laufmittelsystem IV) erhalten und im Falle der chemischen Oxidation auch zusätzlich eine Verbindung mit $R_f = 0,18$, die sich bei der dünnschichtelektrophoretischen Untersuchung als Anion erwies.

Auf Grund dieser Analogie im dünnschichtchromatographischen und -elektrophoretischen Verhalten läßt sich jedoch noch nicht

schließen, daß die in vivo gebildeten, nur durch ihre Radioaktivität nachweisbaren Produkte, 3-Desoxygalaktonolacton bzw. 3-Desoxygalaktensäure wären, denn der dünn-schicht-chromatographische Unterschied zwischen einander entsprechenden On- und Uronsäuren ist im allgemeinen sehr gering, so daß weitere Meßgrößen notwendig wären, um das biologisch gebildete Produkt zuordnen zu können. Wegen der äußerst geringen Substanzmenge waren solche weiterführenden Untersuchungen jedoch nicht durchführbar.

3) Markierte Metabolite

a) Mit Chloroform/Methanol extrahierbare Substanzen

Ähnlich wie nach den Fütterungsversuchen wurden aus Leber und Nieren der zur Bestimmung der Pharmakokinetik getöteten Tiere Chloroform/Methanol-Extrakte hergestellt. Tab. 7 zeigt die hierbei gefundene Verteilung der Radioaktivität auf Extrakt und Rückstand.

Tab. 7. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität bei der Extraktion von Niere und Leber der Ratte mit Chloroform/Methanol zu verschiedenen Zeiten nach der intraperitonealen Applikation von 20,97 μ Ci (50 μ g) 3-Desoxygalaktose-[3,4- 3 H].

	N i e r e			L e b e r	
	5 Min.	30 Min.	60 Min.	60 Min.	105 Min.
Extrakt	58,6 %	54,7 %	42,3 %	35,0 %	28,6 %
Rückstand	41,4 %	45,3 %	57,6 %	65,0 %	71,4 %
S u m m e	100,0 %	100,0 %	99,9 %	100,0 %	100,0 %

Man erkennt, daß der Anteil der mit Chloroform/Methanol extrahierbaren Radioaktivität mit zunehmender Überlebenszeit nach der Applikation ab- und der im Rückstand verbleibende Anteil entsprechend zunimmt.

Wurde der Chloroform/Methanol-Extrakt nach FOLCH durch Zusatz von Wasser entmischt, wanderte die Radioaktivität zum größten Teil in die wäßrige Oberphase (s. Tab. 8).

Tab. 8. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf wäßrige Ober- und lipophile Unterphase bei der Entmischung von Chloroform/Methanol-Extrakten aus Niere und Leber der Ratte durch Wasserzusatz nach FOLCH (35).

Die angegebenen Zeiten bedeuten die Überlebenszeiten des Tieres nach der intraperitonealen Applikation von 20,97 μ Ci (50 μ g) 3-Desoxygalaktose-[3,4- 3 H].

	N i e r e			L e b e r
	5 Min.	30 Min.	60 Min.	60 Min.
hydrophile Oberphase	95,1 %	94,8 %	94,7 %	99,2 %
lipophile Unterphase	4,9 %	5,2 %	5,3 %	0,8 %
S u m m e	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Der Anteil der Radioaktivität in den lipophilen Unterphasen war im Falle der Leberextrakte verschwindend gering und lag im Falle der Nierenextrakte bei 5 %. Radiodünnschichtchromatographisch waren in beiden Fällen keine markierten Substanzen erfaßbar.

Radiodünnschichtchromatographische Untersuchung der FOLCH-Oberphasen der Niere:

Die radiodünnschichtchromatographische Untersuchung der Chloroform/Methanol-Extrakte aus den nach Überlebenszeiten von 5, 30 und 60 Minuten entnommenen Nieren und der daraus hergestellten Oberphasen ergab eine radioaktive Substanz (s. Tab. 9), die sich wie die nach den Fütterungsversuchen erhaltene Substanz X verhielt. Während die Verbindung jedoch dort wegen der vergleichsweise großen verabreichten Mengen von 3-Desoxygalaktose in Substanz nachweisbar war (s. Abb. 4 und Abschnitt B I 4b, S. 13),

konnte hier lediglich die Radioaktivität registriert werden. Beim Vergleich wanderten Radioaktivität und Substanz X in fünf verschiedenen Lösungsmittelsystemen (III, IV, VI, VII und IX) identisch.

Während nach den Fütterungsversuchen die Substanz X nur im Gehirn, nicht aber in den anderen untersuchten Organen Leber, Niere und Magen faßbar war, konnte der Metabolit auf Grund der höheren Empfindlichkeit der Isotopenmethode hier in der Niere und auch in der Leber (s.u.) aufgefunden werden. Es handelt sich also um keine gehirnspezifische Stoffwechselreaktion.

Überraschenderweise war jedoch die Ausgangssubstanz 3-Desoxygalaktose in der Niere zu keinem Zeitpunkt nach der Applikation mehr nachweisbar, obwohl der Zucker, wie Tab. 2 auf S. 10 zeigt, durch die gewählte Methode extrahierbar ist.

Radiodünnschichtchromatographische Untersuchung der FOLCH-Oberphasen aus Niere und Leber nach Applikation höherer Aktivitäten:

Um dies mit erhöhter Nachweisempfindlichkeit schärfer überprüfen zu können, wurde daher fünf sechzehntägigen Ratten die erhöhte Dosis von je 164 μCi (100 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] intraperitoneal injiziert. Nach einer Stunde Überlebenszeit wurden die Tiere getötet, Nieren und Leber entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. 3-Desoxygalaktose war in dem Nierenextrakt wiederum nicht, wohl aber in dem aus Leber nachweisbar. Die FOLCH-Oberphasen beider Organextrakte enthielten die als Substanz X ($R_f = 0,36$) angesprochene Substanz. Daneben erschienen aber nunmehr - wie aus Tab. 9 zu erkennen ist - weitere radioaktive Substanzen: In Niere eine Substanz mit dem R_f -Wert 0,44, die in dem der Tab. 9 zugrundeliegenden Laufmittelsystem IV ähnlich wie 3-Desoxygalaktose wanderte, aber durch das Laufmittelsystem III sicher davon unterschieden werden konnte, und in der Leber neben der schon erwähnten 3-Desoxygalaktose ($R_f = 0,46$), die in den Laufmittelsystemen III, IV, VIII und IX mit der Referenz identisch wanderte, noch eine weitere mit dem R_f -Wert 0,18.

Tab. 9. Radiodünnschichtchromatographisch nachweisbare Substanzen in den FOLCH-Oberphasen der Chloroform/Methanol-Extrakte von Niere, Leber und Gehirn der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach intraperitonealer und intracerebraler Applikation von 3-Desoxygalaktose-[3,4-³H].

R_F-Werte im Laufmittelsystem IV (s. Abschnitt D 3, S. 49).

Organ	Überlebenszeit [Min]	R _f - w e r t e			
		0,46 a)	0,44 b)	0,36 c)	0,18 d)
		3-Desoxygalaktose		Substanz X	On- oder Uronsäure
nach intraperitonealer Applikation von 20,97 µCi/Tier					
	5	-	-	+	-
Niere	30	-	-	+	-
	60	-	-	+	-
nach intraperitonealer Applikation von 164 µCi/Tier					
Niere	60	-	+	+	-
Leber	60	+	-	+	+
nach intracerebraler Applikation von 130 µCi/Tier					
	15	-	-	+	+
	60	-	-	+	+
Gehirn	360	-	-	+	-
	1440	-	-	Spur	-
nach intraperitonealer Applikation von 164 µCi/Tier					
	15	-	-	-	-
	60	+	-	+	+
Leber	360	-	-	-	-
	1440	-	-	-	-

- a) in den Laufmittelsystemen III, IV, VIII und IX identisch mit 3-Desoxygalaktose
b) unbekannt; mit Sicherheit nicht 3-Desoxygalaktose
c) in den Laufmittelsystemen III, IV, VI, VII und IX identisch mit der auf S. 13 beschriebenen Substanz X
d) möglicherweise 3-Desoxygalakton- oder -uronsäure

Die letztere Verbindung erwies sich in der Dünnschichtelektrophorese (bei pH 8,4) als Anion. Möglicherweise handelt es sich um die auch bei der Hydrolyse des Cytosols der Leberzellen erhaltene 3-Desoxygalakton- oder -uronsäure (s. S. 24).

Radiodünnschichtchromatographische Untersuchung von Lipidextrakten aus Gehirn:

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Gehirnlipide ergab keine nachweisbaren radioaktiv markierten Substanzen.

Da dieses in Bezug auf die Bildung von 3-Desoxy-Galaktocerebro-
siden negative Ergebnis nach intraperitonealer Applikation auftrat, wurde es in einem weiteren Versuch gezielt überprüft. Dazu wurden zwölf Jungratten je 130 μCi (100 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] intracerebral injiziert. Nach 15 Minuten, 1, 6 und 24 Stunden wurden je drei Tiere getötet, ihre Gehirne vereinigt, extrahiert und die Extrakte geprüft. Nach "FOLCH-Verteilung" wurden zu allen Zeitpunkten nur etwa 0,5 % der Radioaktivität in der Unterphase gegenüber 99,5 % in der Oberphase gefunden. Da so geringe Aktivitäten radiodünnschichtchromatographisch nicht mehr erfaßbar sind, wurden die in der Unterphase befindlichen Lipide auf Dünnschichtfolien (Laufmittelsystem I) aufgetrennt, diese nach dem Lauf in 1 cm-Stücke zerschnitten und im Szintillationszähler gemessen. Dabei wurden geringe Aktivitäten (< 200 DpM) in den Abschnitten vom Start bis zu einem R_f -Wert von 0,66 gefunden. In dem Bereich von $R_f = 0,72$ bis zur Lösungsmittelfront, in dem eventuell gebildete 3-Desoxy-Galaktocerebroside zu erwarten wären, war keine Radioaktivität nachweisbar.

Die Aktivität in der Oberphase gehörte zwei Substanzen an, von denen die eine mit einem R_f -Wert von 0,36 im Laufmittelsystem IV der Substanz X, die andere mit einem R_f -Wert von 0,18 vermutlich der 3-Desoxygalakton- oder -uronsäure entspricht (s. Tab. 9).

In den nach intracerebraler Injektion von 130 μCi (100 μg) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] je Tier ebenfalls untersuchten FOLCH-Oberphasen der Leberextrakte waren radiodünnschichtchromatographisch

die gleichen Substanzen wie nach intraperitonealer Injektion nachweisbar (s. Tab. 9).

b) Substanzen im Extraktionsrückstand (der Leber)

Der mit Chloroform/Methanol nicht extrahierbare, im Rückstand verbleibende Anteil der Radioaktivität (s. Tab. 7, S. 25) wanderte bei der Dialyse gegen einen Liter destilliertes Wasser zu 98 % in das Dialysat. Dies entspricht den Befunden bei der Dialyse der Zellunterfraktionen der Leber (s. Tab. 6, S. 22).

Wie dort blieb bei der radiodünnschichtchromatographischen Analyse des Dialysats im gleichen Laufmittelsystem (IV) ein erheblicher Anteil der Radioaktivität am Start der Dünnschichtplatte zurück.

Wurde der Rückstand des Dialysats der Hydrolyse mit 2 n Salzsäure unterworfen und das Hydrolysat geprüft, fanden sich im gleichen Laufmittelsystem nunmehr zwei radioaktive Gipfel mit den R_f -Werten 0,55 und 0,18, die dünnschichtchromatographisch 3-Desoxygalaktonolacton bzw. 3-Desoxygalaktensäure entsprechen (s. S. 24). In einem Parallelversuch wurde nur die Substanz mit dem R_f -Wert 0,18 erhalten.

Diese Befunde stehen ebenfalls in Analogie zu den Ergebnissen, die bei der Hydrolyse des Cytosols der Leberzellen gewonnen wurden.

c) Übersicht über die Ergebnisse der Isotopenversuche

Nach intraperitonealer Injektion tritiummarkierter 3-Desoxygalaktose wurde neben mehreren mit Chloroform/Methanol extrahierbaren Substanzen (Tab. 9) auch ein im Rückstand verbleibender Anteil (Tab. 7) gefunden, der sich aber als wasserlöslich und dialysierbar erwies. Die zugrundeliegende Substanz blieb jedoch bei der Dünnschichtchromatographie in allen untersuchten Laufmittelsystemen am Start liegen. Dies entspricht dem Verhalten des höhermolekularen Anteils der Radioaktivität, der nach Zellfraktionierung der Leber aus dem Cytosol durch Gelchromatographie mit einem Mo-

lekulargewicht von etwa 2000 gefunden wurde (Abb. 8). Bei der sauren Hydrolyse wurden daraus zwei radioaktive Produkte (R_f -Werte 0,55 bzw. 0,18 im Laufmittelsystem IV) erhalten, von denen bei der Reinigung das eine in das andere übergeht: Sie verhalten sich ähnlich wie Lacton und Säure. Die Substanz mit dem kleineren R_f -Wert von 0,18 (Laufmittelsystem IV) wurde auch unter den mit Chloroform/Methanol extrahierbaren Substanzen gefunden und erwies sich bei der Dünnschichtelektrophorese als Anion. Die Ausgangssubstanz 3-Desoxygalaktose konnte nach intraperitonealer und intracerebraler Injektion nur in der Leber nachgewiesen werden. Eine weitere mit Chloroform/Methanol extrahierbare Substanz (R_f -Wert 0,36 im Laufmittelsystem IV, Tab. 9) fand sich dagegen in Leber, Nieren und Gehirn. Sie stellt gewissermaßen den "Hauptmetaboliten" der 3-Desoxygalaktose dar und erwies sich in fünf dünn-schichtchromatographischen Laufmittelsystemen auch als identisch mit der nach den Dauerfütterungsversuchen im Gehirn der Tiere der Versuchsgruppe aufgefundenen zusätzlichen Substanz X (Abb. 4). Eine weitere in Tab. 9 aufgeführte Substanz (R_f -Wert 0,44) trat dagegen nur in den Nieren nach intraperitonealer Applikation relativ hoher Aktivitäten (164 μ Ci) auf; weitere Hinweise auf ihre Natur bestehen nicht.

III) Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Strukturermittlung des Stoffwechselproduktes Desoxy-Dulcit

Von allen in Leber, Nieren und Gehirn der Versuchstiere durch ihre Radioaktivität nachgewiesenen Folgeprodukten der markierten 3-Desoxygalaktose konnte demnach nur das mit dem R_f -Wert von 0,36 in Tab. 9 charakterisierte nach der Verfütterung hoher Dosen des Desoxyzuckers auch in Substanz nachgewiesen werden. Im folgenden Abschnitt werden die Isolierung, Reindarstellung und chemische Konstitutionsermittlung dieser Verbindung beschrieben. Befunde, die an den übrigen, nur durch ihre Radioaktivität nachweisbaren Produkten erhoben wurden, werden nur am Rande erwähnt.

1) Dünnschichtchromatographie

Zunächst wurde versucht, die Substanz durch Verwendung gruppenspezifischer Sprühreagenzien näher zu charakterisieren. Dazu wurde eine kleine Menge (250 µg) durch präparative Dünnschichtchromatographie (Laufmittelsystem IV) gereinigt. Je 50 µg wurden neben den unten genannten für das Reagenz jeweils typischen Referenzsubstanzen aufgetragen und im Laufmittelsystem IV entwickelt.

Ninhydrin färbte die Substanz nicht an. Im Vergleich dazu gab D-Galaktosamin positive Reaktion.

HANES' Reagenz auf Phosphate (41) färbte ebenfalls nicht an. Als positive Vergleichssubstanzen dienten hier D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal und β -Glycerophosphat.

Anilinphthalat, charakteristisch für reduzierende Zucker (42), färbte die Substanz X nicht an, dagegen die Referenzsubstanzen 3-Desoxygalaktose und D-Galaktose.

Joddampf, der von Lipiden absorbiert wird und diese deshalb als braune Flecken erscheinen läßt (43), gab ebenfalls negative Reaktion. Im Gegensatz dazu wurden als Vergleichssubstanzen verwendete Ganglioside bzw. Cholesterin angefärbt.

2) Dünnschichtelektrophorese

Auf Kieselgel, das mit 0,02 m Natriumhydrogencarbonatlösung als Elektrolyt getränkt war, wanderte die Substanz im elektrischen Feld wie die elektrisch neutralen Referenzsubstanzen 3-Desoxygalaktose oder D-Glucose, d.h. sie wurde wie diese Substanzen in Richtung Kathode bewegt. Dies ist jedoch auf den elektroosmotischen Effekt des Kieselgels zurückzuführen, das sich beim Benetzen gegenüber Wasser negativ auflädt. Da das Medium relativ dazu positiv geladen ist, wandert es in Richtung Kathode und führt elektrisch neutrale Moleküle dabei mit.

Säureanionen wandern dagegen in Richtung Anode. Dies war bei der als Referenzsubstanz aufgetragenen D-Glucuronsäure und bei der in

Tab. 9 mit einem R_f -Wert von 0,18 (Laufmittelsystem IV) gekennzeichneten Substanz der Fall.

3) Hydrolyseversuche

Wurde die radioaktive Substanz $X^{1)}$ acht Stunden in 2 n Salzsäure gekocht, so erfolgte keine Veränderung ihres R_f -Wertes (Laufmittelsystem IV). In einem Kontrollversuch wurde 3-Desoxygalaktose-[3,4- 3H] der gleichen Behandlung unterzogen. Erwartetermaßen zeigten sich auch hierbei keine radiodünnschichtchromatographisch nachweisbaren Veränderungen.

4) Säulenchromatographische Isolierung

Durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel G (s. Abschnitt D III 4) gelang es, die Substanz X aus dem Rückstand der FOLCH-Oberphase des nach den Fütterungsversuchen aus dem Gehirn der Tiere gewonnenen Gesamtlipidextraktes (s. S. 10) zu reinigen. Aus 53,8 mg Oberphasen-Rückstand wurden dabei 1,02 mg dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz erhalten.

5) Gaschromatographie

Wie aus Abb. 9a ersichtlich, wurde auch bei der Gaschromatographie der in das Trimethylsilylderivat (44) überführten Substanz nur ein Gipfel erhalten. Dies beweist erstens die Reinheit der Substanz und deutet darüber hinaus auf die aufgehobene Anomerie am C-Atom 1 der Verbindung hin. Im Gegensatz dazu ergaben nämlich die Trimethylsilylderivate von 3-Desoxygalaktose (Abb. 9b) oder D-Galaktose, wegen der Möglichkeit der Zucker in pyranoider und furanoider Form jeweils α/β -Anomerie zu zeigen, je nach Lage des Gleichgewichtes bis zu vier Gipfel. Die Gesamtretentionszeiten, die unter den im Abschnitt D 4 geschilderten gaschromatographischen Bedingungen erhalten wurden, sind in Tab. 10 angegeben.

1) Verwendet wurde Substanz, die aus den Nieren des Tieres mit 30 Minuten Überlebenszeit durch Chloroform/Methanol-Extraktion, "FOLCH-Verteilung" und präparative Dünnschichtchromatographie isoliert wurde.

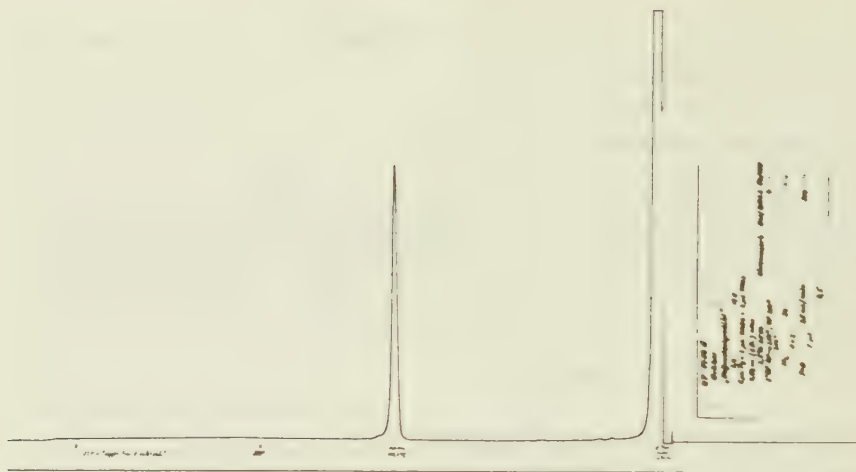


Abb. 9a. Gaschromatogramm der in das Trimethylsilylderivat überführten Substanz X.

50 µg der gereinigten Verbindung werden in 6 µl absolutem Pyridin aufgenommen, nacheinander mit je 2 µl Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und der Niederschlag abzentrifugiert (44). Vom Überstand werden 3,9 µl (19,5 µg) eingespritzt. Abschwächungsfaktor $8 \cdot 10^3$. Weitere gaschromatographische Bedingungen s. Abschnitt D 4, S. 52.

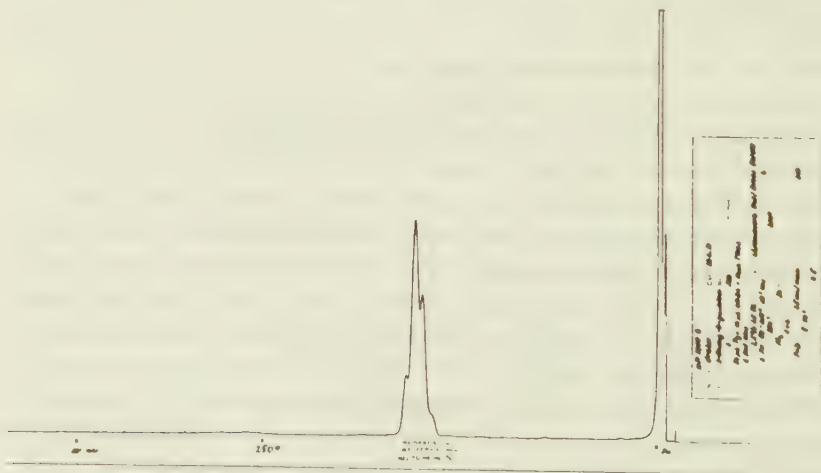


Abb. 9b. Gaschromatogramm der in das Trimethylsilylderivat überführten 3-Desoxygalaktose.

5,33 mg der Substanz werden unter den im Abschnitt D 4 angegebenen Bedingungen trimethylsilyliert. Vom Überstand werden 3 µl (320 µg) eingespritzt. Abschwächungsfaktor $8 \cdot 10^2$. Weitere gaschromatographische Bedingungen s. Abschnitt D 4, S. 52.

Tab. 10. Gesamtretentionszeiten der trimethylsilylierten Substanz X und der einzelnen Gipfel der trimethylsilylierten Gleichgewichtsgemische von 3-Desoxygalaktose und D-Galaktose.

Gaschromatographische Bedingungen wie in den Legenden zu Abb. 9a, b und im Abschnitt D 4, S. 52.

Gesamtretentionszeiten [Min]								
D-Galaktose					29,9		30,9	32,0
3-Desoxygalaktose	26,0	27,0	27,8	28,8				
Substanz X						30,0		

6) Massenspektrum

Für die Vermessung des Massenspektrums wurde die Substanz X wiederum in das Trimethylsilylderivat überführt. Die dem - wie vorher demonstriert gaschromatographisch einheitlichen - Gipfel zugehörige Substanz gelangte nach Abtrennung des Trägergases in das Massenspektrometer und unterlag dort der Zerlegung in kationische Fragmente. Dabei wurden Bruchstücke mit folgenden m/e-Verhältnissen registriert ¹⁾: 511, 437, 436, 423, 333, 321, 307, 243, 231, 217, 205, 129 und 103 ME (Masseneinheiten). Da es sich um eine trimethylsilylierte Verbindung handelt, ist zu erwarten, daß einige der registrierten Massenzahlen zueinander Gewichts-differenzen aufweisen, die durch die Abspaltung von Trimethylsilylfragmenten zustande kommen. Solche bei der Fragmentierung von Trimethylsilylderivaten vorkommenden Bruchstücke sind (45):



¹⁾ Für die Messung des Massenspektrums und seine Interpretation danke ich Fräulein Ingrid Buhrow und Herrn Dr. Wolfram Schäfer vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Diese Kenntnis erlaubt es, die oben aufgeführte Liste der Massenzahlen in ein Schema zu bringen, das zwischen größeren, aber ansonsten unversehrten Bruchstücken des Gesamtmoleküls (Primärfragmenten) und Sekundärfragmenten, die aus den ersteren durch Abspaltung der drei Trimethylsilylfragmente hervorgegangen sind, zu unterscheiden (s. Abb. 10).

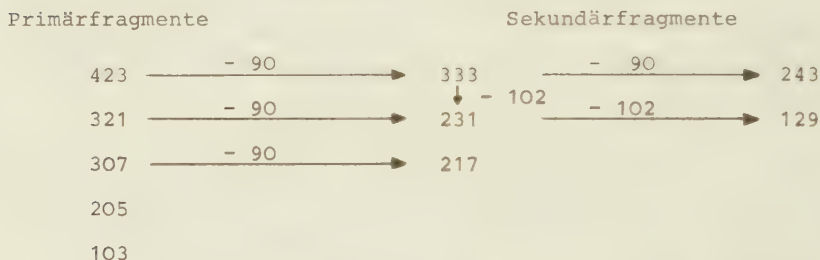


Abb. 10. Schematische Aufteilung der gefundenen Massenzahlen in Primärfragmente und solche Sekundärfragmente, die daraus durch Abspaltung der Trimethylsilylfragmente $(\text{CH}_3)_3\text{Si-O}\cdot$ (89 ME), $(\text{CH}_3)_3\text{Si-OH}$ (90 ME) und $(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-CH}\cdot$ (102 ME) hervorgehen.

Man erkennt ferner, daß man durch Addition der Massen 90, 89 sowie 15 (Methylgruppe) zu den höchsten gefundenen Massenzahlen 436, 437 und 511 jeweils den (als solchen nicht registrierten) Wert 526 erhält, so daß es sinnvoll scheint, diesen Wert - zunächst probeweise - als die Masse des Moleküls der Verbindung, als ihr Molekulargewicht, zu betrachten. Tut man dies, so ergibt sich weiter, daß man durch formalen Abzug von fünf Trimethylsilylgruppen auf ein Molekulargewicht von 166 für das zugrundeliegende Molekül der Substanz X kommt, 2 Masseneinheiten mehr als das Ausgangsprodukt 3-Desoxygalaktose (MG 164) besitzt. Es könnte sich demnach um das Reduktionsprodukt des Zuckers, den Zuckeralkohol 3-Desoxydulcit (3-Desoxygalaktit) handeln.

Wie das Schema in Abb. 11 zeigt, lassen sich die gefundenen Primärfragmente tatsächlich der Struktur eines trimethylsilylierten 3- oder 4-Desoxyhexits zuordnen.

$\text{H}_2\text{C}^1 - \text{O} - \text{TMS}$	103
-----	423
$\text{H C}^2 - \text{O} - \text{TMS}$	205
-----	(321)
$\text{H C}^3 - \text{H}$	(219)
-----	307
$\text{H C}^4 - \text{O} - \text{TMS}$	321
-----	205
$\text{H C}^5 - \text{O} - \text{TMS}$	423
-----	103
$\text{H}_2\text{C}^6 - \text{O} - \text{TMS}$	

Abb. 11. Massenzahlen von Primärfragmenten, die bei der Zerlegung eines trimethylsilylierten Hexits (MG 526) an den durch die gestrichelten Linien angedeuteten Stellen zu erwarten wären.

Primärfragmente, die durch Zerlegung des Moleküls zwischen C-Atom 2 und 3 bzw. 3 und 4 - also neben der Desoxygruppierung - entstehen würden, sind nicht zu erwarten, da die Stabilisierung einer positiven Ionenladung auf der CH_2 -Gruppe energetisch zu ungünstig ist. Die entsprechenden Massenzahlen (219 und 321) in Abb. 11 sind deshalb in Klammern gesetzt. Das Bruchstück mit der Masse 219 trat auch tatsächlich nicht auf, wohl aber eines mit der Masse 321, das aber aus der Spaltung zwischen den C-Atomen 4 und 5 herrührt.

Über die sterischen Verhältnisse gibt das Massenspektrum keine Auskunft (die Strukturformel in Abb. 11 ist daher rein schematisch zu verstehen), es liegt aber nahe, sich das Molekül aus 3-Desoxygalaktose abgeleitet zu denken.

7) Synthese

Durch Behandlung mit Natriumborant (46) wird 3-Desoxygalaktose zum entsprechenden, sterisch analogen Zuckeralkohol 3-Desoxydulcit (3-Desoxygalaktit) reduziert.

Es ist mit der Substanz X dünnstschichtchromatographisch identisch (Laufmittelsysteme IV und IX, s. Abschnitt D 3). Die Trimethylsilylderivate zeigen gaschromatographisch die gleiche Retentionszeit ($t_{dr} = 30,0$ Minuten) und ihre Massenspektren sind identisch. Nimmt man synthetisches 3-Desoxydulcit zusammen mit radioaktiver Substanz X in Pyridin auf und prüft das trimethylsilylierte Gemisch radiogaschromatographisch, so koinzidieren die Gipfel der Signale von Radioaktivität und Flammenionisationsdetektor (s. Abb. 12).

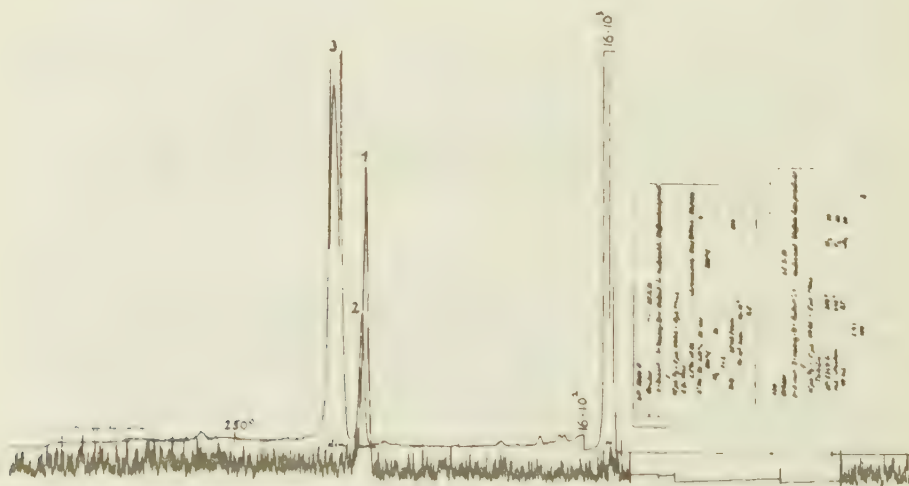


Abb. 12. Radiogaschromatogramm der Trimethylsilylderivate von synthetischem 3-Desoxydulcit und isolierter markierter Substanz X; daneben D-Dulcit als Referenzsubstanz.
 Kurve 1: Radioaktivitätsgipfel
 Kurve 2: 3-Desoxydulcit (FID-Signal)
 Kurve 3: D-Dulcit (FID-Signal)

Die Verschiebung der Gipfel von Radioaktivität und Flammenionisationsdetektor gegeneinander ist eine durch die beiden Schreibsysteme des Doppelkompensationsschreibers bedingte Apparatekonstante.

8) Spektrum der kernmagnetischen Resonanz

Die Spektren der kernmagnetischen Resonanz¹⁾ von Substanz X und synthetischem 3-Desoxydulcit sind identisch. Sie lassen in der Region von 3,5 -4 ppm die Signale der Protonen an den Sauerstoff-tragenden Kohlenstoffatomen, und um 1,6 ppm die der Desoxy-Gruppe erkennen.

IV) Enzymatische Untersuchungen mit 3-Desoxy-D-galaktose

Die Einschleusung der Galaktose in den Stoffwechsel geschieht im wesentlichen durch eine zweistufige Aktivierung, die über das Galaktose-1-phosphat zur Uridindiphosphat-Galaktose führt. Diese Verbindung hat einerseits ein genügend hohes Gruppenübertragungspotential, um den Einbau des Galaktoseanteils in komplexe Moleküle wie Glycoproteine oder Galaktosphingolipide zu ermöglichen und stellt andererseits das Substrat für die Umwandlung in das Glucosederivat durch den 4-Epimerase-Schritt des LELOIR-Weges dar (47).

Die erste Stufe dieser Aktivierung bildet die Phosphatübertragung von Adenosintriphosphat (ATP) auf die 1-Stellung der Galaktose unter der Wirkung des Enzyms Galaktokinase.

1) Galaktokinase aus Hefe²⁾

Hier wurde geprüft, ob auch 3-Desoxygalaktose Substrat dieses phosphorylierenden Enzyms sein kann, oder ob sie Inhibitorwirkung in Bezug auf die Phosphorylierung der Galaktose zeigt.

1) Für die Anfertigung und Interpretation der kernmagnetischen Resonanzspektren danke ich Fräulein Gertraud Schild und Herrn Dr. Johann Sonnenbichler vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

2) Verwendet wurde in dieser Studie im Handel erhältliche Galaktokinase aus Hefe, da die Enzyme aus Hefe und Rattenleber (58) sehr ähnliche Substratspezifitäten besitzen.

Benützt wurde ein von BALLARD (48) beschriebener optischer Test (s. Schema in Abb. 13). Dabei wird in einer zweiten, der Galaktosephosphorylierung nachgeschalteten Reaktion, das in der Kinasereaktion entstehende Adenosindiphosphat (ADP) durch Phosphatübertragung von Phosphoenolpyruvat unter der Wirkung von Pyruvatkinase wieder zum ATP regeneriert. Das in dieser Reaktion entstehende Pyruvat wird dann in einer dritten Reaktion mit Hilfe von NADH unter der Wirkung von Lactat-Dehydrogenase zur Milchsäure reduziert, wobei die Abnahme des reduzierenden Coenzym in bekannter Weise (49) durch Messung der Extinktion bei 340 nm verfolgt werden kann.

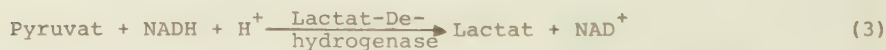


Abb. 13. Schema des zusammengesetzten optischen Tests (48), mit Hilfe dessen die Phosphorylierung von D-Galaktose (bzw. 3-Desoxygalaktose oder 2-Desoxygalaktose) durch Messung der Extinktionsabnahme bei 340 nm optisch verfolgt wurde.

Da die nachgeschalteten Reaktionen (2) und (3) im Vergleich zur Phosphorylierungsreaktion (1) sehr schnell ablaufen, stellt diese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und der Verlauf der Abnahme der Extinktion bei 340 nm nach (3) ist repräsentativ für den Verlauf der Galaktosephosphorylierung (1).

Abb. 14 gibt die zeitlichen Verlaufskurven für die Phosphorylierung von D-Galaktose, 2-Desoxy-D-galaktose und 3-Desoxy-D-galaktose als Substrat wieder.

Man kann außerdem erkennen, wie rasch die Reaktion abläuft, wenn ADP eingesetzt wird, also nur die Reaktionen (2) und (3) im Schema der Abb. 13 in Gang gesetzt werden.

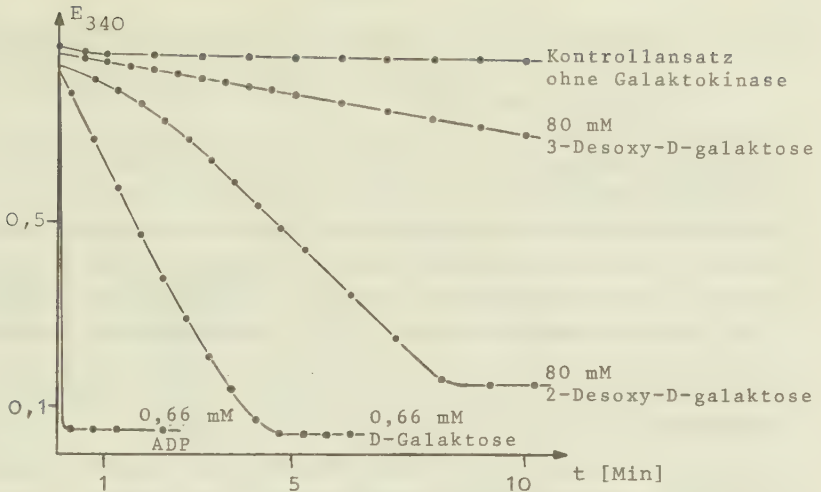


Abb. 14. Zeit-Umsatz-Kurven der Phosphorylierung von D-Galaktose, 2-Desoxy-D-galaktose, 3-Desoxy-D-galaktose und ADP sowie eines Kontrollansatzes ohne Galaktokinase.

Eingesetzt wurden jeweils 2 μMol D-Galaktose bzw. ADP und 240 μMol 2-Desoxy-D-galaktose bzw. 3-Desoxy-D-galaktose; übrige experimentelle Bedingungen s. Abschnitt D IV 1, S. 71.

Für D-Galaktose, 2-Desoxy-D-galaktose und 3-Desoxy-D-galaktose wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion für eine Reihe verschiedener Substratkonzentrationen bestimmt, daraus die Diagramme nach der Methode von LINEWEAVER und BURK (50) gezeichnet (s. Abb. 15a, b, c) und die scheinbaren MICHAELIS-Konstanten bestimmt, die in Tab. 11 zusammengefaßt sind.

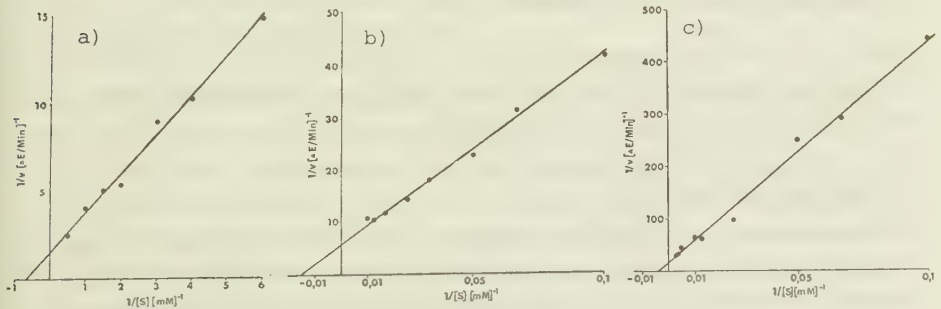


Abb. 15. LINEWEAVER-BURK-Diagramme der Galaktokinase-Reaktion.
a) D-Galaktose; b) 2-Desoxy-D-galaktose;
c) 3-Desoxy-D-galaktose

Experimentelle Details s. Abschnitt D IV 1, S. 71. Die daraus ermittelten scheinbaren MICHAELIS-Konstanten s. unten in Tab. 11.

Tab. 11. Gemessene und Literaturwerte der scheinbaren MICHAELIS-Konstanten in der Galaktokinase-katalysierten Phosphorylierung von D-Galaktose, 2-Desoxy-D-galaktose und 3-Desoxy-D-galaktose.

Die angegebenen Maximalgeschwindigkeiten sind auf den Wert für D-Galaktose gleich 1,00 bezogen.

Experimentelle Details s. Abschnitt D IV 1, S. 71.

Substrat	K_M [mM]		Rel. $v_{Max.}$	gemessener Konzentrationsbereich des Substrats [mM]	Zahl der experimentellen Punkte
	gemessen	Lit.			
D-Galaktose	1,3 ± 0,3	0,9;1,1 (51;52)	1,00	0,083 - 5	24
2-Desoxy-D-galaktose	44,1 ± 18,7	20;108 (53;51)	0,42	10 - 120	24
3-Desoxy-D-galaktose	210 ± 79,5	-	0,11	10 - 360	32

Die ermittelten scheinbaren MICHAELIS-Konstanten stimmen mit den für D-Galaktose und 2-Desoxy-D-galaktose vorhandenen Literaturangaben überein, die im Falle der 2-Desoxy-D-galaktose ihrerseits allerdings erheblich voneinander abweichen (s. Tab. 11). Für 3-Desoxy-D-galaktose wurde die scheinbare MICHAELIS-Konstante hier zum ersten Mal bestimmt. Der gefundene hohe Wert deutet auf eine geringe Affinität des Substrats zum Enzym hin, deren Gründe weiter unten diskutiert werden.

Damit in Einklang steht der Befund, daß 3-Desoxy-D-galaktose in keinem der überprüften Molverhältnisse¹⁾ die Phosphorylierung der D-Galaktose zu hemmen vermochte.

2) Hexokinase aus Hefe

Mit käuflicher Hexokinase aus Hefe zeigte 3-Desoxy-D-galaktose keinen Umsatz und vermochte bei äquimolarem Konzentrationsverhältnis die Phosphorylierung der Glucose auch nicht zu hemmen.

1) Eingesetzt wurden 2 µMol D-Galaktose und dazu in verschiedenen Ansätzen 2, 4, 30 und 60 µMol 3-Desoxy-D-galaktose je Küvette.

C) DISKUSSION

Wie eingangs erwähnt, wurden mit der bisher pharmakologisch nicht geprüften 3-Desoxygalaktose zuerst Fütterungsversuche vorgenommen, um ihre Verträglichkeit für die Versuchstiere und die Grenze der anwendbaren Dosierung festzustellen. Unerwarteterweise zeigt die Substanz selbst in der relativ hohen Tagesdosis von 10 g je kg Ratte keine Toxizität. Dies steht in auffälligem Gegensatz zur analogen 2-Desoxygalaktose (17) sowie zur Galaktose selbst, die in äquimolarer Menge in Verbindung mit dem für Galaktosämiker bestimmten Spezialnahrungsmittel MBF Gerber bereits am zweiten Fütterungstag schwere Vergiftungserscheinungen hervorruft, von denen Muskelzittern und plötzliche Sprünge zur Käfigdecke eine Beteiligung des Nervensystems deutlich machen. Durch einmalige Gabe von Glucose und anschließender Verwendung von Lactose anstelle der Galaktose konnten die Symptome aber rasch zum Verschwinden gebracht werden.

Im übrigen zeigen die künstlich ernährten Versuchstiergruppen ungeachtet der verschiedenen Nahrungszusätze analoge Kurven der Gewichtszunahme (Abb. 2a, b), die auf Grund der limitierten Nahrungszufuhr etwa 20 % langsamer erfolgte als bei den bei der Mutter verbliebenen Tieren, denen überdies Preßfutter ad libitum angeboten wurde. Diese knappe Nahrungszufuhr war notwendig, um die Tiere zu veranlassen, die gesamte Tagesdosis 3-Desoxygalaktose bzw. Lactose zu sich zu nehmen.

Für die Giftigkeit der Galaktose wird, obwohl der Beweis bisher nicht erbracht werden konnte, auf Grund von Untersuchungen an Galaktosämikern Galaktose-1-phosphat verantwortlich gemacht (54), das infolge des Ausfalls der UDP-Glucose: Galaktose-1-phosphat Uridyltransferase (EC 2.7.7.12) in den Zellen dieser Patienten angehäuft wird (55). Daneben wird der Zucker durch die in Geweben weit verbreitete Aldose-Reduktase (EC 1.1.1.21) (56) zum Dulcitol reduziert, der aber, abgesehen von Linsentrübungen, keine schwereren Symptome hervorruft, wie das Krankheitsbild der durch

einen Galaktokinasemangel ausgelösten Galaktosurie zeigt (57).

Die Betrachtung dieser Sachverhalte macht auch die mit 3-Desoxygalaktose erhobenen Befunde erklärlich: Da der Zucker von Galaktokinase (EC 2.7.1.6) vermutlich nur sehr langsam phosphoryliert wird, bauen sich keine merklichen Phosphatesterkonzentrationen im Organismus auf, die zu dramatischen toxischen Wirkungen führen könnten.

Nach ALVARADO (53) sind nämlich für die Fixierung des Substrates an die Galaktokinase die Hydroxylgruppen in den Positionen 3, 4 und 6 des Zuckermoleküls und ihre sterische Konfiguration wichtig. Mit der hier untersuchten Galaktokinase aus Hefe (*Kluyveromyces fragilis*) wurde die 3-Desoxygalaktose nur mit etwa 10 % der Geschwindigkeit von Galaktose selbst umgesetzt (Tab. 11). Außer dieser verringerten Umsatzgeschwindigkeit deutet die hohe MICHAELIS-Konstante von 210 mM - im Einklang mit dem Postulat ALVARADOS - auf eine verminderte Stabilität der Enzym-Substrat-Verbindung hin.

Da die Galaktokinase aus Rattenleber (58) eine sehr ähnliche Substratspezifität wie das Hefeenzym besitzt, kommt neben der im Vergleich zur Galaktose geringeren Phosphorylierungsrate als Konkurrenzreaktion die Reduktion zum Zuckeralkohol stärker zum Zuge, so daß das Produkt 3-Desoxydulcit nach den Fütterungsversuchen aus dem Gehirn der Tiere isoliert und hier erstmals als Stoffwechselprodukt der 3-Desoxygalaktose charakterisiert werden konnte. Als katalysierendes Enzym dürfte auch hier die NADPH-abhängige Aldose-Reduktase wirken, da sie in allen untersuchten Säugergeweben eine ähnlich breite Substratspezifität besitzt (56,59,60) und in vielen Geweben der Ratte nachgewiesen werden konnte (61).

2-Desoxygalaktose wird von diesem Enzym nicht reduziert (56), da für seine Wirkung eine Hydroxylgruppe in 2-Stellung des Zuckers notwendig ist (62). Aus diesem Grunde verläuft der Stoffwechsel der 2-Desoxygalaktose ausschließlich über die

Phosphorylierung und den LELOIR-Weg bis zum 2-Desoxyglucose-6-phosphat. Dieses bleibt, da es wegen der fehlenden Hydroxylgruppe am C-Atom 2 von der Phosphohexose-Isomerase (EC 5.3.1.9) nicht mehr weiter umgewandelt werden kann, liegen; alle Vorprodukte: 2-Desoxyglucose-1-phosphat, UDP-2-Desoxyglucose, UDP-2-Desoxygalaktose und 2-Desoxygalaktose-1-phosphat häufen sich ebenfalls an und erklären die stark toxische Wirkung der 2-Desoxygalaktose (63).

Die nach einmaliger intraperitonealer Injektion tritiummarkierter 3-Desoxygalaktose erhaltenen Kurven des Verlaufs der auf das Feuchtgewicht bezogenen spezifischen Radioaktivität in den verschiedenen Organen (Abb. 6a, b) lassen von einem Spitzenwert, der im Blut nach weniger als 5 Minuten, in den Organen nach etwa 10 Minuten erreicht wird, drei Phasen des Abfalls erkennen: Die erste, steile dauert bis etwa 6 Stunden, die zweite bis 24 Stunden nach der Applikation. Von da an nimmt die Aktivität in allen Organen in der dritten Phase gleichmäßig weiter ab und beträgt nach 21 Tagen nur noch etwa 0,1 % des Spitzenwertes.

Die Ausgangssubstanz 3-Desoxygalaktose ist in der Leber neben 3-Desoxydulcit und einer markierten Substanz mit Säurecharakter (möglicherweise 3-Desoxygalakton- oder -uronsäure) noch nach einer Stunde nachweisbar, während sie aus den Nieren bereits nach 5 Minuten und aus dem Gehirn nach 15 Minuten verschwunden ist (Tab. 9). QUAN-MA und WELLS (64) konnten durch Verfütterung hoher Galaktose-Dosen an der Ratte indirekt zeigen, daß die Aldose-Reduktase-Aktivität von allen Organen in der Leber am niedrigsten ist. Überträgt man diesen an der Reduktion der Galaktose zu Dulcit erhobenen Befund auf 3-Desoxygalaktose, wird verständlich, warum nach einer Stunde 3-Desoxygalaktose nur noch in der Leber faßbar ist: Aus den übrigen Organen ist sie wegen der höheren Reduktase-Aktivitäten bereits verschwunden.

Bei der Auftrennung von Leberhomogenat in Zellunterfraktionen verbleibt die Aktivität zu 76 % im Cytosol. Die geringen Anteile

in den partikulären Fraktionen sind nur lose gebunden und wandern bei der Dialyse aus. Überraschenderweise sind eine Stunde nach der Applikation im Cytosol der Leberzelle nur etwa 38 % der Radioaktivität niedermolekular, 62 % jedoch in einen Molekülverband mit einem Molekulargewicht von etwa 2000 gebunden. Die Verbindung entspricht höchstwahrscheinlich jenem Anteil der Radioaktivität, der nach Chloroform/Methanol-Extraktion im Rückstand verbleibt: Auch dieser wandert bei der Dialyse durch den Schlauch (Ausschlußgrenze ca. MG 15000) ins Dialysat, bleibt bei der Dünnschichtchromatographie (Laufmittelsystem IV) am Start liegen und ergibt bei der Hydrolyse zwei Substanzen, die sich im gleichen Lösungsmittelsystem wie die als Lacton und Säure bezeichneten verhalten. Zudem kann gezeigt werden, daß dieser mit Chloroform/Methanol nicht extrahierbare Anteil der Radioaktivität mit der Überlebenszeit der Tiere wächst und nach 60 Minuten in der Leberzelle ziemlich genau den gleichen Wert erreicht (57,6 gegen 62,2 %), wie er bei der Gelchromatographie des Cytosols gefunden wurde (Tab. 7).

Indirekt läßt sich daraus vermuten, daß ein Teil der 3-Desoxygalaktose oder eines Oxidationsproduktes in der Leber phosphoryliert werden, denn ohne vorherige Aktivierung wäre ein Einbau schwer erklärbar. Bei der sauren Hydrolyse der Verbindung erhält man radioaktive Spaltprodukte, die sich dünnschichtchromatographisch wie Lacton und Säure verhalten, wobei offen bleibt, ob die Oxidation an C₁ oder C₆ des Zuckermoleküls stattfand. Es ist möglich, daß die oben erwähnte bis 24 Stunden dauernde zweite Phase des Verlaufs der Radioaktivitätskurve durch den Stoffwechsel dieser höhermolekularen Verbindung bestimmt wird.

Der langdauernde langsame Aktivitätsabfall im letzten, von 24 Stunden bis 21 Tagen dargestellten Teil der Kurve in Abb. 6b ist vermutlich auf tritiumhaltiges Wasser zurückzuführen: Erstens ist bekannt, daß Tritiumaktivität aus vielen organischen Verbindungen im Stoffwechsel schließlich im Wasser erscheint (65), zweitens wurde gelegentlich beim Eindampfen verschiedener Fraktionen flüchtige Radioaktivität in der Vorlage gefunden und

drittens deutet auch die Abklingzeit von 21 Tagen auf Wasser hin (66).

In hochmolekulare Verbindungen fand kein Einbau statt. Eine Stunde nach intraperitonealer Injektion von tritiummarkierter 3-Desoxygalaktose ließ sich weder in der durch Zusatz von 41 % Trichloressigsäure erhaltenen Proteinfraction des Cytosols der Rattenleber Radioaktivität nachweisen, noch in den nach Zusatz von 4 % Cetylpyridiniumchlorid ausfallenden Mucopolysacchariden (Tab. 5). Auch der erwartete Einbau des Desoxyzuckers in (Desoxy-) Cerebroside oder andere normalerweise galaktosehaltige Lipide fand nicht statt. Selbst nach intracerebraler Injektion einer Aktivität von 130 μ Ci 3-Desoxygalaktose-[3,4- 3 H] konnte nach FOLCH-Verteilung zu keiner Zeit Radioaktivität in der den Cerebrosiden entsprechenden dünn-schicht-chromatographischen Region nachgewiesen werden.

Da die 3-Desoxygalaktose kaum oder im Vergleich mit Galaktose oder 2-Desoxygalaktose nur in sehr geringem Umfang phosphoryliert wird, scheint sie als Analogon geeignet zu sein, die nicht über Aktivierung verlaufenden Nebenwege des Galaktosestoffwechsels eingehender zu untersuchen, wie sie z.B. das Krankheitsbild der durch Galaktokinase-mangel hervorgerufenen Galaktosurie bestimmen.

D) EXPERIMENTELLER TEIL

1) Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden an 15-18 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten ohne Berücksichtigung des Geschlechts (Fa. Jauds, Kisslegg/Allgäu) durchgeführt. Muttertiere wurden mit Altromin-Standardhaltungsfutter Nr. 1320 ernährt. Alle Tiere erhielten Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden durch Dekapitieren getötet und die benötigten Organe rasch entnommen. Die Gewebe wurden sofort aufgearbeitet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2) Chemikalien, Substrate, Enzyme

Triäthanolaminhydrochlorid, Tris(hydroxymethyl)aminomethan und DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal wurden von der Fa. Boehringer (Mannheim), D-Glucuronsäure, 2-Desoxy-D-galaktose und Maltose von der Fa. Fluka (Neu-Ulm), Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose und England-Ganglioside von der Fa. Koch-Light Lab. (Colnbrook, England), Dextranblau, D-Dulcitol, Galaktosaminhydrochlorid, Rinderserumalbumin und sämtliche Lipide von der Fa. Serva (Heidelberg) und β -Glycerophosphat von der Fa. Sigma Chemie (Neubiberg) bezogen. Der interne Standard n -[1,2(n)- ^3H]-Hexadekan stammte von Fa. Amersham Buchler (Braunschweig). Alle anderen Chemikalien, soweit im Folgenden nicht anders angegeben, waren Handelsprodukte des Reinheitsgrades p.A. der Fa. E. Merck (Darmstadt).

Die Substrate D-Galaktose und D-Glucose wurden von der Fa. E. Merck (Darmstadt), die Hilfssubstrate Phosphoenolpyruvat, ADP, ATP, NADH, NAD^+ und NADP^+ sowie die Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Lactat-Dehydrogenase, Pyruvatkinase und Galaktose-Dehydrogenase von Fa. Boehringer (Mannheim) und Galaktokinase von der Fa. Sigma Chemie (Neubiberg) bezogen.

Unmarkierte 3-Desoxy-D-galaktose wurde in einer fünfstufigen Synthese nach WEYGAND und WOLZ dargestellt (25). Die Synthese des in den Positionen 3 und 4 mit Tritium markierten Zuckers ist in der Diplomarbeit ausführlich beschrieben (26). Die spezifische Radioaktivität von 3-Desoxy-D-galaktose-[3,4-³H] betrug 6,114 mCi/mg oder 1,004 mCi/ μ Mol.

3) Dünnschicht- und Radiodünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographischen Analysen fanden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck-Nr. 5721) Verwendung. Alle Chromatographien wurden bei Kammersättigung vorgenommen.

Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet:

- | | | |
|---|----------------|------|
| I: Chloroform : Methanol : Wasser, | 14 : 6 : 1 | (67) |
| II: Hexan : Diäthyläther : Eisessig, | 87 : 13 : 1 | (68) |
| III: Chloroform : Methanol : 10 % Ammoniaklsg., | 60 : 35 : 8 | (69) |
| Bei Verwendung dieses Laufmittelsystems werden die Platten nach dem Lauf ca. 3 Std. im Trockenschrank bei 40 °C reaktiviert und ein zweites Mal im gleichen System chromatographiert. | | |
| IV: Essigsäureäthylester : konz. Essigsäure : Methanol : Wasser, | 12 : 3 : 3 : 2 | (70) |
| V: Essigsäureäthylester : Propylamin : Methanol : Wasser, | 12 : 3 : 3 : 2 | |
| VI: n-Propanol : Wasser, | 7 : 3 | (71) |
| VII: n-Butanol : 96 % Äthanol : konz. Ammoniaklsg. : Wasser, | 2 : 6 : 2 : 1 | (72) |
| VIII: n-Propanol : konz. Ammoniaklsg. : Wasser, | 50 : 24 : 13 | (73) |
| IX: Essigsäureäthylester : 65 % Isopropanol, | 13 : 7 | (74) |

Laufzeiten für DC-Fertigplatten Kieselgel 60 in den Systemen:

I: ca.	90-100 Min.	für 18 cm	Wanderungsstrecke
II: ca.	70 Min.	für 18 cm	"
III: ca.	120 Min.	für 18 cm	"
IV: ca.	135 Min.	für 18 cm	"
V: ca.	200 Min.	für 18 cm	"
VI: ca.	480 Min.	für 15 cm	"
VII: ca.	240 Min.	für 17 cm	"
VIII: ca.	300 Min.	für 17 cm	"
IX: ca.	120 Min.	für 18 cm	"

Zur Registrierung der Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten fand ein Radiodünnschichtscanner Typ II (Fa. Berthold/Friezeke, Karlsruhe-Durlach) Verwendung.

Zur Erfassung von Radioaktivitäten unterhalb der Nachweisgrenze des Radiodünnschichtscanners wurde die zu untersuchende Bahn in 20 1 cm-Zonen eingeteilt und die mit dem Dünnschichtscraper 120220 (Fa. Desaga, Heidelberg) von der Platte abgeschabte Kieselgelschicht jeder Zone im Szintillationszähler untersucht (75). Vereinfacht wird dieses Verfahren durch die Anwendung von DC-Plastikfolien Kieselgel 60 (Schichtdicke 0,2 mm; Merck-Nr. 5748). Nach der Chromatographie im gewünschten Laufmittelsystem wurde die Folie in 1 cm-Stücke zerschnitten und deren Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt (76).

Sprühreagenzien:

a) Reagenz nach KÄGI-MIESCHER (37)

Die nach dem Lauf gründlich vom Lösungsmittel befreiten Trennschichten werden mit einem Gemisch aus konz. Essigsäure, konz. Schwefelsäure und Anisaldehyd (4-Methoxy-benzaldehyd) im Volumenverhältnis 49 : 1 : 0,3 durchfeuchtet und im Trockenschrank 15-20 Min. auf 120-140 °C erhitzt. Dabei ergeben sich wenig beständige, jedoch charakteristische Anfärbungen für die einzelnen Substanzen. Der Farbton ist jeweils nach dem R_f -Wert in Klammern angegeben. Nach einiger Zeit weichen diese Farben einem einheitlich bräunlichen Ton.

b) Molybdatophosphorsäure-Reagenz (77)

Die im Laufmittelsystem II auftrennbaren Substanzen Cholesterin, freie Fettsäuren, Di- und Triglyceride und Cholesterinester werden mit Molybdatophosphorsäure (5 % in Äthanol) bis zur blassen Grünfärbung besprüht und anschließend bis zur optimalen Farbentwicklung (ca. 15 Min.) auf 120 °C erhitzt. Die Substanzen erscheinen als blaue Flecken auf gelbem Grund, die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 µg.

c) HANES' Reagenz auf Phosphate (41)

Zum Nachweis von Phosphaten werden die Trennschichten mit folgendem Reagenz behandelt: 5 ml 60 %ige Perchlorsäure, 10 ml 1 n Salzsäure und 25 ml 4 %ige wäßrige Ammoniummolybdatlösung werden mit aq. dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Die Platte wird nach gleichmäßiger Durchfeuchtung genau 7 Min. im Trockenschrank auf 85 °C erhitzt und danach aus 20-30 cm Entfernung mit ultravioletem Licht 20-25 Min. bestrahlt.

Die Färbemethode ergibt rein blaue Flecken. Durch das Lagern der Platten über mehrere Tage an einem lichtschwachen Ort nimmt die Leuchtkraft der Flecken bedeutend zu.

d) Ninhydrin-Sprühareagenz 0,1 % (Merck-Nr. 6758)

Die mit dem Reagenz besprühten Platten werden bis zur optimalen Farbentwicklung der Flecken (ca. 15 Min.) bei 120 °C erhitzt. Positiv reagierende Substanzen erscheinen als purpurrot bis violett gefärbte Flecken auf rosafarbenem Untergrund.

Es ist zu beachten, daß es bei der Verwendung von ammoniakhaltigen Fließmitteln zur Bildung ninhydrinpositiver Flecken bei der Dünnschichtchromatographie reiner Zucker an Kieselgel kommen kann (78).

e) Anilinphthalat-Sprühareagenz (Merck-Nr. 1266) (42)

Zum Nachweis reduzierender Zucker werden die Trennschichten mit Anilinphthalat-Reagenz durchfeuchtet und 10 Min. auf 105 °C erhitzt. Man erhält auf schwach bräunlichem Untergrund braune Flecken, die im längerwelligen UV-Licht eine gelbbraune Fluoreszenz zeigen. Nicht reduzierende Substanzen werden nicht angefärbt. Die Nachweisgrenze liegt bei 1-5 µg.

f) Joddampf (43)

Die Platte wird in ein geschlossenes Gefäß gebracht und 5 Min. einer konzentrierten Jodatmosphäre ausgesetzt. Danach wird das überschüssige Jod durch Stehenlassen an der Luft entfernt. Viele organische Substanzen ergeben eine braune Färbung.

4) Gaschromatographie

Für alle gaschromatographischen Analysen kam ein Gaschromatograph Typ 5750 G der Fa. Hewlett Packard (Frankfurt/Main) zur Anwendung.

Arbeitsbedingungen:

Säule:	1,83 m (6 feet) Glas, ϕ 1/8 Zoll
stationäre Phase:	2,5 % SE 52
Träger:	Chromosorb W AW/DMCS 80-100 mesh
Trägergas:	Stickstoff 30 ml/Min.
Temperatur:	2 Min. 80 °C isotherm ("post injection interval"), Programm 4 °/Min., 80-250 °C, 20 Min. 250 °C isotherm ("upper limit interval")
Strömungsteilung:	1 + 2
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (Wasserstoff: 25 ml/Min., Luft: 300 ml/Min.)
Verdampfer und Überleitung:	300 °C

Zucker und Zuckerderivate mit freien Hydroxylgruppen werden nach SWEELEY et al. (44) in die Trimethylsilylderivate überführt. Dazu wird die über P_2O_5 getrocknete Substanz in Mengen von 0,5-4 mg eingewogen und in 60 μ l abs. Pyridin aufgenommen. Anschließend fügt man nacheinander 20 μ l Hexamethyldisilazan und 20 μ l Trimethylchloresilan zu und schüttelt 6-10 Min. bei Raumtemperatur. Nach Abzentrifugieren des entstandenen Niederschlages spritzt man je nach eingesetzter Menge 0,5-2 μ l in den Gaschromatographen.

Radiogaschromatographie

Zur Messung der Radioaktivität nach der gaschromatographischen Trennung werden 2/3 des die Trennsäule verlassenden Trägergasstromes einem Durchflußreaktor mit Proportionalzählrohr (Mod. RGC 170, Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen) zugeführt.

Der Gasstrom wird mit der gleichen Menge (20 ml/Min.) nachgereinigten Wasserstoffs vermischt und passiert dann ein auf 640° C geheiztes, mit Katalysator (51,7 % Eisenspäne 0,3-0,5 mm; 22,2 % grobes Zinkpulver; 7,4 % Kobaltoxid; 5,9 % Nickeloxid; 3,9 % Vanadiumpentoxid und 9,1 % Chromosorb 60-80 mesh) beschichtetes U-Rohr. Die Anordnung arbeitet nach dem Prinzip des hydrierenden Crackens (79) und überführt höhermolekulare, schwerflüchtige Verbindungen in niedermolekulare gasförmige, so daß das bei Raumtemperatur arbeitende Zählrohr nicht durch kondensierende radioaktive Substanzen kontaminiert wird. Vor dem Passieren des im Proportionalbereich arbeitenden 10 ml-Durchflußzählrohres werden der Gasströmung als Zählgas 20 ml/Min. Methan beigemischt, so daß das Zählrohr von einem Gesamt-Gasstrom von 60 ml/Min. (20 ml/Min. Träger-Stickstoff, 20 ml/Min. Wasserstoff und 20 ml/Min. Methan) durchströmt wird. Die dem Zählrohr angeschlossene Elektronik (LB 241 K; Fa. Berthold/Frieske, Karlsruhe-Durlach) erlaubt sowohl eine Registrierung der Größe Impulse/Zeit ("Ratemeterschaltung") als auch eine Registrierung der Summe der Impulse ("Integrationsschaltung"). Bei strenger Konstanthaltung des Gasstromes sind damit quantitative Messungen und Vergleiche möglich.

Die vom Flammenionisationsdetektor des Gaschromatographen und vom Zählrohr herkommenden Signale werden nach der Verstärkung einem Doppelkompensationsschreiber (Fa. Hewlett-Packard, Frankfurt/Main) zugeführt, so daß Substanzmenge und Radioaktivität simultan registriert werden können.

Zu I) Dauerverfütterung von 3-Desoxy-D-galaktose an junge Ratten während der Myelinisierung

1) Tierexperimentelles

Für die Fütterungsversuche wurden 24 Tiere aus 3 Würfen in 4 Gruppen zu je 6 Tiere aufgeteilt. Als Nahrungsgrundlage diente MBF Gerber (Fa. Gerber Products, Fremont, Mich., USA), eine spezielle galaktosefreie Diät. Sie enthält im Trockensubstanzanteil (26 %) 7,8 % Fett, 6,8 % Protein, 9,9 % Kohlenhydrate (Stärke und Rohrzucker) und 1,5 % Asche sowie Vitamine und Spurenelemente.

Zur Bereitung der täglich angebotenen Nahrung werden für die Tiere der Gruppe II 2,5 g D-Galaktose (Merck-Nr. 4062) bzw. 4,75 g D-Lactose (Merck-Nr. 7657 E) und für die der Gruppe IV 16,4 g einer 14%igen wäßrigen 3-Desoxygalaktose-Stammlösung mit Wasser auf je 51 g Lösung aufgefüllt und diese mit je 105 g MBF Gerber gründlich vermischt. Für die Tiere der Gruppe III werden 105 g MBF Gerber mit 51 g Wasser ohne Zusätze verdünnt (s. Tab. 1 im Abschnitt B I).

Um Nahrungsverluste durch Vermischen des Breis mit dem Einstreumaterial zu vermeiden, werden in die Käfige der ohne Muttertiere gehaltenen Ratten an den Seiten 2 cm nach unten gebogene Drahtgitter (Maschenweite 5 x 5 mm) eingepaßt, auf denen 25 cm² große Kunststoffplättchen befestigt werden.

3) Histologische Technik ¹⁾

Perfusion:

Das Tier wird mit Äther tief narkotisiert und rasch das Herz freigelegt. Das rechte Herzhorn, eine seitliche Ausbuchtung des Vorhofes, wird abgeschnitten. Wenn kein Blut mehr ausfließt, führt man in den linken Ventrikel des Herzens eine Hohnadel mit weitem Lumen ein, durch die unter Druck (der nicht höher als der Blutdruck des Tieres sein darf) 4%ige Formalinlösung eingeleitet wird. Das Gefäßsystem wird mit insgesamt etwa 200 ml Formalinlösung durchspült.

Danach werden die Organe Gehirn, Leber, Milz und Magen entnommen und in 4%iger Formalinlösung aufbewahrt.

Anfertigung der histologischen Präparate:

Fixierte Gewebestückchen von einigen Millimetern Durchmesser werden nach dem Entfernen des überschüssigen Fixierungsmittels durch Wässern und anschließendem Entwässern in Paraffin eingebettet, geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen.

¹⁾ vgl. Fußnote, S. 9

Die vom Paraffin befreiten Schnitte (Xylol, absteigende Alkoholreihe) werden zur Färbung der Kerne mit saurem Hämalaun nach P. MAYER behandelt, die Nachfärbung des Plasmas erfolgt mit einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von Erythrosin (80).

4) Lipidchemische Untersuchungen

1. Herstellung von Gesamtlipidextrakten

Extraktion bei Raumtemperatur: (81)

Gehirn und Leber werden nach der Feuchtgewichtsbestimmung pro Gramm Frischgewicht mit 20 ml Chloroform/Methanol 2:1 (Vol./Vol.) versetzt und mit dem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator 3 Min. gründlich homogenisiert. Anschließend filtrierte man die Suspension unter sorgfältigem Nachspülen durch ein fettfreies Faltenfilter. Die Prozedur wird zweimal wiederholt.

Heißextraktion:

Das feucht und nach der Gefriertrocknung (ca. 48 Std.) gewogene Gewebe wird in der Apparatur nach SOXHLET mit heißem Chloroform/Methanol 2:1 6 Std. extrahiert. Das pulverisierte Gewebe wird in eine Extraktionshülse (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) geeigneter Größe gegeben und diese in den Einsatz eines SOXHLET-Extraktors gestellt. Der angeschlossene Rundkolben ist etwa mit dem doppelten Volumen des Soxhlets mit Chloroform/Methanol 2:1 mit Zusatz an 0,2 % Wasser gefüllt. Das Lösungsmittel wird unter Rückfluß erhitzt.

Die Extraktionshülsen werden vor Gebrauch durch eine dreistündige Heißextraktion gereinigt.

Die Lipidextrakte werden nach Entfernen des Lösungsmittels über Calciumchlorid und Paraffinschnitzeln im Vakuum getrocknet und ausgewogen. Sie lassen sich im Kühlschrank in gut verschlossenen Gefäßen monatelang ohne Veränderungen aufbewahren.

2. "FOLCH-Verteilung" (35)

Der Gesamtlipidextrakt wird in Chloroform/Methanol 2:1 gelöst; wenn nötig, werden unlösliche Anteile abfiltriert. Das Filtrat wird in einem Scheidetrichter mit 25 % des Filtratvolumens mit Wasser versetzt, das Gemisch gut durchgeschüttelt und zur scharfen Phasentrennung ca. 12 Std. stengelassen. Nach erfolgter Phasentrennung wird die Oberphase sorgfältig mit einer Pipette abgehoben und die Unterphase langsam durch den Schliffhahn abgelassen.

Zur weiteren Reinigung werden Ober- und Unterphase mit den den abgetrennten Phasen entsprechenden Volumina idealer Unter- bzw. Oberphase ("FOLCH-Verteilung" mit reinen Lösungsmitteln) dreimal gewaschen. Die vereinigten Ober- und Unterphasen werden zur Trockne einrotiert, im Vakuum über Calciumchlorid und Parafinschnitzeln getrocknet und ausgewogen.

a) Lipide der FOLCH-Unterphasen

1. Säulenchromatographische Auftrennung gangliosidfreier Gehirnlipidextrakte (82)

Abtrennung der Phosphatide:

Von staubförmigen Anteilen befreites, 15 Std. bei 50-60 °C aktiviertes Florisil 60-100 mesh (Fa. Floridin Co., Pittsburgh, USA; Bezugsquelle: Fa. Winkler, Hamburg) wurde mit Chloroform/Methanol 2:1 (Vol./Vol.) in ein Chromatographierohr von 1 cm Durchmesser zu einer Trennsäule 1 x 43 cm (Säulenvolumen 33,8 ml) geschlämmt und mit 359,6 mg gangliosidfreiem Gehirnlipidextrakt (Lipide der FOLCH-Unterphase) in 2 ml Chloroform/Methanol 2:1 beladen. Als Elutionsmittel wurde das gleiche Lösungsmittelgemisch benutzt und das Eluat in 6 gleiche Fraktionen zu je 34 ml eingeteilt. Nach Wägung und dünnschichtchromatographischer Prüfung im Laufmittelsystem I wurde in den Fraktionen 1-5 insgesamt 119,8 mg phosphatidfreier Lipidrückstand erhalten.

Weitere Auftrennung des phosphatidfreien Lipidextraktes:

100 g Magnesiumsilikat neutral (Aktivitätsstufe I) (Fa. M. Woelm, Eschwege) wurden in einer Schliffflasche mit 25 g Wasser versetzt und 15 Std. kräftig geschüttelt (Aktivitätsstufe IV). So entaktiviertes Magnesiumsilikat wurde mit Chloroform zu einer Trennsäule von 1 x 38 cm (Säulenvolumen 29,85 ml) geschlämmt und mit 119,8 mg phosphatidfreiem Lipidrückstand in 1 ml Chloroform beladen. Nacheinander wurde mit folgenden Lösungsmittelgemischen eluiert:

A:	5	Säulenvolumina	Chloroform	:	Methanol	:	Wasser	100	:	0	:	0
B:	5	"	"	"	"	98	:	2	:	0,2		
C:	5	"	"	"	"	96	:	4	:	0,4		
D:	5	"	"	"	"	94	:	6	:	0,5		
E:	5	"	"	"	"	92	:	8	:	0,7		
F:	5	"	"	"	"	90	:	10	:	0,9		

Das Eluat wurde in 60 Fraktionen zu je 15 ml eingeteilt. Nach Wägung der zur Trockne gebrachten Fraktionen und ihrer dünnschichtchromatographischen Analyse im Laufmittelsystem I (Sprühreagenz nach KÄGI-MIESCHER) wurde folgende Substanzverteilung gefunden:

- Fraktion 1 - 5: Cholesterin (58,25 mg)
- Fraktion 6 - 13: Cholesterin und eine unidentifizierte Substanz (9,05 mg)
- Fraktion 14 - 21: eine weitere unbekannte Substanz (2,10 mg)
- Fraktion 22 - 32: eine dritte unidentifizierte Substanz (1,55 mg)
- Fraktion 33 - 39: Kerasin (2,75 mg)
- Fraktion 40 - 44: Kerasin und Cerebron (7,40 mg)
- Fraktion 45 - 60: Cerebron (13,25 mg)

2. Hydrolyse dreier isolierter Lipide mit Salzsäure (69)

2,5 mg der in den Fraktionen 6 - 13 enthaltenen Substanz wurden mit 1 ml 2 n Salzsäure und je 1 mg der in den Fraktionen 14 - 21 und 22 - 32 enthaltenen Substanzen wurden mit je 0,5 ml 2 n Salzsäure 8 Std. rückflußgekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die filtrierte Hydrolysate dreimal mit je 1 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurden die wäßrigen

Phasen gefriergetrocknet und die Rückstände nach der Wägung in je 0,1 ml Wasser gelöst.

3. Dünnschicht- und gaschromatographische Analyse der Zuckerbestandteile

110 µg der in der wäßrigen Phase der Fraktionen 6 - 13 enthaltenen Substanz und je 55 µg der in den wäßrigen Phasen der Fraktionen 14 - 21 und 22 - 32 enthaltenen Substanzen wurden neben D-Galaktose und 3-Desoxygalaktose als Testsubstanzen auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen und im Laufmittelsystem VIII chromatographiert. Nach Anfärbung mit dem Reagenz nach KÄGI-MIESCHER wurde in den drei Proben je eine Substanz nachgewiesen, die den gleichen R_f -Wert (0,41) und den gleichen Farbton (grün) wie D-Galaktose besaß.

440 µg der in der wäßrigen Phase der Fraktionen 6 - 13 enthaltenen Substanz und je 165 µg der in den wäßrigen Phasen der Fraktionen 14 - 21 und 22 - 32 enthaltenen Substanzen wurden über P_2O_5 getrocknet und unter den im Abschnitt D 4 angegebenen Bedingungen in die Trimethylsilylderivate überführt. Je 2 µl der Überstände wurden unter den im Abschnitt D 4 angegebenen Bedingungen gaschromatographiert.

5) Blut - Urin - Faeces

Blut wurde nach dem Dekapitieren aus dem Nacken gesammelt, durch Zusatz einiger Tropfen einer 5 %igen Natrium-EDTA-Lösung ungerinnbar gemacht und stehengelassen. Wenn sich die Erythrocyten auf etwa die Hälfte der Flüssigkeitssäule abgesenkt hatten, wurde das überstehende Plasma abpipettiert und die Erythrocyten durch Zugabe von Wasser hämolysiert. Das Blutplasma und das hämolysierte Blut wurden 10 Min. bei 2000 UpM (Christ-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Jeweils die Überstände wurden für die dünnschichtchromatographische Analyse verwendet.

Urin wurde durch Punktion der Harnblase gewonnen.

Die Faeces wurden unter Zugabe von je 4 Volumina (Gew./Vol.) Wasser dreimal nacheinander homogenisiert (POTTER-ELVEHJEM-Homogeni-

sator) und bei 5000 x g zentrifugiert (Rotor SS 34, Sorvall RC2-B). Die Überstände wurden vereinigt, gefriergetrocknet und der Trokenrückstand in 1 ml Wasser gelöst.

Je 0,05 ml Überstand des Blutplasmas, des hämolysierten Blutes, Urin und wässriger Extrakt der Faeces wurden in den Laufmittelsystemen III und IV neben 3-Desoxygalaktose und Substanz X als Referenzsubstanzen dünnschichtchromatographisch untersucht.

Zu II) Einmalige Gabe tritiummarkierter 3-Desoxy-D-galaktose

1) Verteilung der Radioaktivität im Organismus

1. Tierexperimentelles

Die Tiere, die für Experimente mit einmaliger Applikation radioaktiver 3-Desoxygalaktose verwendet wurden, befanden sich bis 60 Min. vor Versuchsbeginn und bei längeren Versuchszeiten als 6 Std. sofort nach der Injektion bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung in der Obhut der Muttertiere; bei kürzeren Versuchszeiten als 6 Std. wurden sie bei Wasserangebot von den Muttertieren getrennt gehalten.

Die Applikation radioaktiver 3-Desoxygalaktose erfolgte stets in ungepufferter wässriger Lösung.

2. Injektionen

Intraperitoneale Injektion:

Das Tier wird in der Hand fixiert und ist mit dem Kopf nach unten gelagert, damit die Eingeweide in den oberen Teil der Bauchhöhle fallen. Vorsichtig sticht man die Nadel (Pravaz-Kanüle Nr. 16) senkrecht durch die linke untere Bauchdeckenseite etwa 0,5-1 cm tief in das Abdomen.

Pro Tier wurden 0,1 ml der wässrigen Lösung von 3-Desoxygalaktose-[3,4-³H] injiziert.

Intracerebrale Injektion:

Das Tier wird mit Äther leicht narkotisiert und man sticht die Nadel einer 10 µl-Hamiltonspritze durch die Fontanellen etwa 2-3 mm tief in das Stirnhirn.

Pro Tier wurden 0,01 ml der wäßrigen Lösung von 3-Desoxygalaktose-[3,4-³H] injiziert.

3. Flüssigkeitsszintillationsmessung der Radioaktivität

Für genaue Radioaktivitätsbestimmungen wurde ein Flüssig-Szintillations-Analysator PW 4510/01 (Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) oder ein Nuclear Chicago Mark II benützt.

Biologisches Probenmaterial wird in Mengen von 10-100 mg in Glas-szintillationsgefäße eingewogen und in 1 ml des Gewebelösers Soluene 350 (Fa. Packard Instrument, Frankfurt/Main) bei Raumtemperatur aufgelöst und nach Zugabe von 10 ml des Fertigszintillators Dimilume (Fa. Packard Instrument, Frankfurt/Main) gezählt.

Alle in organischen Lösungsmitteln gelösten Proben wurden in 10 ml Dimilume gezählt. Wäßrige Proben wurden in 10 ml des Fertigszintillators Unisolve-1 (Fa. Koch-Light Lab., Colnbrook, England) gezählt, da dieses Zählmedium das Zumischen von maximal 50 % Wasser erlaubt und noch gute Zählausbeuten liefert.

Von Dünnschichtplatten abgekratzte Kieselgelproben und Stücke von Kieselgelfolien wurden ebenfalls in Unisolve-1 gezählt und durch Zugabe von einigen ml Wasser in Suspension gehalten.

Alle Proben wurden drei- bis fünfmal 10 Min. gezählt und die Mittelwerte gebildet. Die erhaltenen CpM-Werte wurden zur Quenchkorrektur mit internem Standard (n-Hexadekan-[³H]) nach der Formel

$$\frac{\text{CpM}_{\text{Probe}} + \text{Standard} - \text{CpM}_{\text{Probe}}}{\text{DpM}_{\text{Standard}}} \cdot 100 = \text{Zählausbeute (in \%)}$$

$$\frac{\text{CpM}_{\text{Probe}}}{\text{Zählausbeute (in \%)}} \cdot 100 = \text{DpM}_{\text{Probe}}$$

auf die wahren Zerfälle pro Minute umgerechnet.

Die Ausbeuten betrugen je nach Stärke der Löschung (Quench) für Tritium zwischen 15 und 50 %.

2) Verteilung innerhalb der (Leber)-Zelle

a) Veranschaulichung nach der Methode von DE DUVE

1. Gewebefraktionierung

Die Gewebefraktionierung erfolgte nach dem von SAWANT et al. (39) modifizierten Verfahren von DE DUVE et al. (38) durch Differentialzentrifugation. Alle Aufarbeitungsschritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Die angegebenen Vielfachen der Erdbeschleunigung sind auf den mittleren Radius des jeweils verwendeten Rotors bezogen.

8 Ratten wurden durch Dekapitieren getötet, die Lebern rasch entnommen, vereinigt, gewogen, in 9 Volumina (Gew./Vol.) 0,25 m Saccharoselösung gegeben und grob zerkleinert. Anschließend wurden die Lebern in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator mit Teflon-Stempel mit drei Auf- und Abwärtsbewegungen des Gefäßes gegen das rotierende Pistill (1500 U/Min.) homogenisiert.

Das 10 %ige Homogenat wurde nach dem Filtrieren über Gaze 10 Min. bei 830 x g (Rotor GSA, Sorvall RC2-B) zentrifugiert. Das erhaltene Präzipitat, das Zellkerne, intakte Zellen und Zelltrümmer enthielt, wurde in der Hälfte des Ausgangsvolumens an 0,25 m Saccharoselösung erneut homogenisiert und 10 Min. bei 830 x g zentrifugiert. Das gewonnene Präzipitat wurde als rohe Kernfraktion (N) bezeichnet. Die bei den beiden Zentrifugationen erhaltenen Überstände wurden vereinigt und 20 Min. bei 16800 x g zentrifugiert (Rotor SS 34, Sorvall RC2-B), wodurch im Niederschlag die rohe Mitochondrienfraktion (M) abgetrennt wurde. Der Überstand wurde 60 Min. bei 100000 x g zentrifugiert (Rotor 50 Ti, Beckman Spinco L3-50), wobei als Präzipitat die Mikrosomenfraktion (P) und im Überstand die lösliche Fraktion (S) gewonnen wurden.

Die rohe Kern- und Mitochondrienfraktion sowie die Mikrosomenfraktion wurden gefriergetrocknet, ausgewogen und in definierten Volumina isotonischer Kaliumchloridlösung (1,19 g KCl/100 ml) resuspendiert.

Die Radioaktivität der Zellunterfraktionen wurde nach dem Auflösen in Soluene 350 (s. S. 60) im Szintillationszähler bestimmt.

2. Proteinbestimmung (83)

Der Proteingehalt der subzellulären Fraktionen wurde nach der Methode von LOWRY et al. gemessen. Als Standard diente kristallisiertes Rinderserumalbumin.

b) Versuche zur Charakterisierung der löslichen radioaktiven Substanzen des Cytosols

1. Fällungsreaktionen mit Trichloressigsäure und Cetylpyridiniumchlorid (Dreifachbestimmung)

Jeweils 0,1 ml der löslichen Fraktion (44785 DpM) wurden mit 0,5 ml 49 %iger Trichloressigsäurelösung oder mit 0,5 ml 5 %iger Cetylpyridiniumchloridlösung versetzt und 60 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Die entstandenen Niederschläge wurden anschließend abzentrifugiert und einige Male mit Wasser gewaschen. Die Radioaktivität der mit den Waschflüssigkeiten vereinigten Überstände sowie die der Niederschläge wurde im Szintillationszähler bestimmt (Auflösung der Niederschläge in Soluene 350, s. S. 60).

2. Dialyse der Zellunterfraktionen

Je 1 ml der in isotonischer Kaliumchloridlösung resuspendierten rohen Kernfraktion (74822 DpM), rohen Mitochondrienfraktion (58959 DpM) und Mikrosomenfraktion (22955 DpM) und 1 ml der löslichen Fraktion (447850 DpM) wurden in Dialysierschläuchen mit einer Durchlässigkeitsgrenze von ca. 15000 Dalton 48 Std. gegen je 1 l dest. Wasser und anschließend 0,5 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Das nicht dialysierbare Material wurde sorgfältig aus dem Schlauch entfernt, gefriergetrocknet und zur Szintillationszählung in Soluene 350 (s. S. 60) gelöst. Die Radioaktivität aliquoter Teile der Dialysate und der Schläuche wurde im Szintillationszähler gemessen.

3. Versuch einer Molekulargewichtsbestimmung

In ein 1 m langes Plexiglasrohr mit Anschlußstücken für LKB-Fertigsäulen versehen wurde Biogel P2 (-400 mesh; Fa. Bio-Rad Lab., München) in dest. Wasser zu einer Trennsäule (1,5 x 98,4 cm, Säulenvolumen 173,9 ml) geschlämmt. Die Säule wurde mit einem in 0,4 ml Wasser gelösten Gemisch aus dem Rückstand von 3 ml (entsprechend $2,93 \times 10^6$ DPM) gefriergetrockneter löslicher Fraktion (Cytosol) und je 2,5 mg D-Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose, zu dem 0,1 ml einer gesättigten wäßrigen Dextranblaulösung hinzugefügt wurden, mit einer Schlauchquetschpumpe (Fa. LKB Produkter AB, Bromma, Schweden) (Pumpvolumen: ca. 4,5 ml/Std.) beladen. Als Elutionsmittel wurde dest. Wasser benützt und das Eluat in 200 Fraktionen zu je 1 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Gilson Microcol TDC 80) aufgefangen.

0,1 ml jeder Fraktion wurden für die Radioaktivitätsbestimmung im Szintillationszähler und 0,01 ml für die dünnenschichtchromatographische Analyse im Laufmittelsystem VIII verwendet.

Die Abschätzung der Molekulargewichte der beiden auftrennbaren Radioaktivitätsgipfel (s. Abb. 8, S. 23) erfolgte analog dem von der Herstellerfirma für die Eichung des Gels mit Peptiden angegebenen Verfahren (84). Trägt man graphisch den Quotienten aus Elutionsvolumen (v_E) und Ausschlußvolumen (v_O) gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts auf, so erhält man eine Kurve, auf der sich die gesuchten Molekulargewichte näherungsweise bestimmen lassen.

Zur genauen Eichung, insbesondere zur Sicherung des linearen Teils der Kurve, wären Oligosaccharide mit Molekulargewichten über 1000 wünschenswert gewesen, die jedoch nicht verfügbar waren. Wegen der vermuteten Kohlenhydratnatur der zu untersuchenden Substanzen wurde die Eichung der Säule mit Zuckern gegenüber der mit Peptiden bevorzugt.

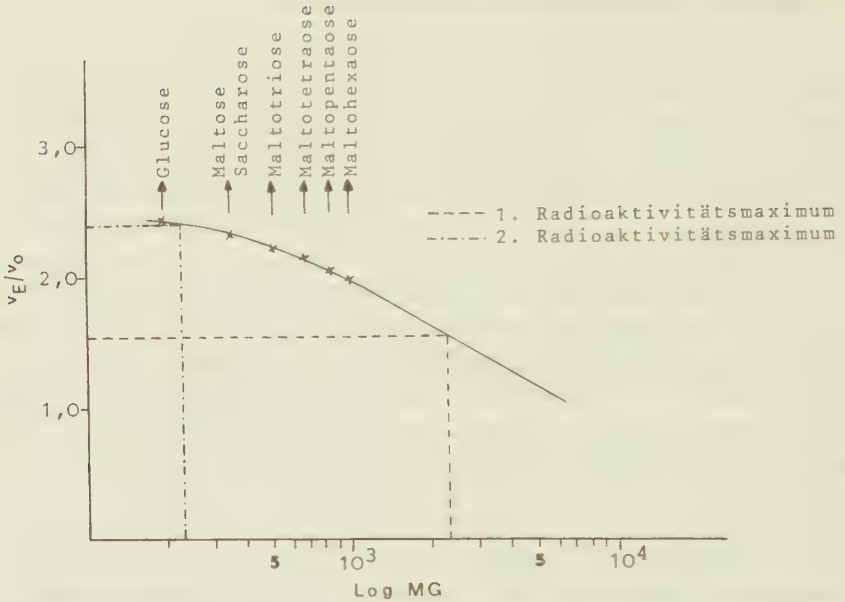


Abb. 16. Eichkurve für die Abschätzung der Molekulargewichte zweier radioaktiver Substanzen nach Gelchromatographie des Cytosols an Biogel P2.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus des Molekulargewichtes (Log MG)
 Ordinate: Elutionsvolumen (v_E) / Ausschlußvolumen (v_0)
 Zur Bestimmung von Ausschlußvolumen und Elutionsvolumina diente die Fraktion mit dem Intensitätsmaximum der jeweiligen Substanz im Eluat.

4. Hydrolyse der löslichen Fraktion (Cytosol) mit Salzsäure (69)

Der nach Gefriertrocknung von 0,2 ml der löslichen Fraktion (89570 DpM) erhaltene Rückstand wurde mit 0,5 ml 2 n Salzsäure 8 Std. rückflußgekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der dunkelbraun gefärbte unhydrolysierbare Rückstand abzentrifugiert, dreimal mit je 0,1 ml Wasser gewaschen, in Soluene 350 gelöst und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Der mit den Waschflüssigkeiten vereinigte Überstand wurde über Nacht in einem halbevakuieren Exsikkator über Kaliumhydroxid

gehalten und anschließend gefriergetrocknet. Der Trockenrückstand wurde mit Wasser auf 0,1 ml aufgefüllt. Davon wurden dreimal je 10 μ l zur Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler verwendet und 30 μ l auf einer Kieselgel-Platte im Laufmittelsystem IV dünnschichtchromatographiert.

Nach der radiodünnschichtchromatographischen Analyse wurde der Radioaktivitätsgipfel anhand des Scanner-Diagrammes auf der Platte markiert und die Substanz mit dem Kieselgel ausgekratzt. Das Kieselgel wurde fünfmal mit je 2 ml Wasser extrahiert und jeweils abzentrifugiert (2000 UpM, Christ-Tischzentrifuge). Die vereinigten Überstände wurden gefriergetrocknet, der Trockenrückstand in 0,1 ml Wasser aufgenommen und erneut im Laufmittelsystem IV chromatographiert.

5. Synthese von 3-Desoxy-D-galaktonolacton

chemisch: (85)

10 mg (60,92 μ Mol) 3-Desoxy-D-galaktose und 16,8 mg (85,13 μ Mol) Bariumcarbonat werden in einem Glasgefäß mit teflonbeschichteter Schraubkappe in 1 ml Wasser gelöst bzw. suspendiert. Das Ganze wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 3,8 μ l (73,95 μ Mol) Brom versetzt. Die Mischung wird weiter bei 0 °C gerührt, bis das Brom vollständig in Lösung gegangen ist und dann 36 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehengelassen. Nach dem Entfernen des überschüssigen Broms durch Belüften des Reaktionsgefäßes und Abzentrifugieren des Bariumcarbonates erhält man eine farblose Lösung, die dünnschichtchromatographisch untersucht wird.

enzymatisch: (86)

10 mg (60,92 μ Mol) 3-Desoxy-D-galaktose und 48,5 mg (73,1 μ Mol) NAD^+ werden in 1,2 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 8,6 gelöst und 0,2 ml (1 U) Galaktose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (D-Galaktose: NAD^+ 1-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.48) (1 mg/ml; spezifische Aktivität 5 U/mg) hinzugefügt. Der Ansatz wird 24 Std. bei 30 °C inkubiert.

3) Markierte Metabolite

b) Substanzen im Extraktionsrückstand (der Leber)

1. Dialyse

459 mg (ca. $1,17 \times 10^7$ DpM) pulverisierter Leberrückstand von Tieren mit 60 Min. Überlebenszeit nach intraperitonealer Applikation von 164 μ Ci markierter 3-Desoxygalaktose je Tier wurden in einem Dialysierschlauch mit einer Durchlässigkeitsgrenze von ca. 15 000 Dalton 72 Std. gegen 1 l dest. Wasser dialysiert. Zur weiteren Aufarbeitung s. S. 62.

2. Hydrolyse des Dialysates mit Salzsäure (69)

12,6 mg (ca. $4,66 \times 10^5$ DpM) des nach Gefriertrocknung des Dialysates erhaltenen Trockenrückstandes wurden mit 3 ml 2 n Salzsäure 8 Std. rückflußgekocht. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie auf S. 64/65 beschrieben.

Zu III) Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Strukturermittlung des Stoffwechselproduktes Desoxy-Dulcit

2) Dünnschichtelektrophorese

Für die Dünnschichtelektrophorese, die in der Kammer der Fa. Desaga (Heidelberg) ausgeführt wurde, finden mit Kieselgel G nach STAHL (Merck-Nr. 7731) selbst beschichtete Platten (20 x 20 cm, Schichtdicke 0,3 mm) Verwendung. Eine lufttrockene Platte wird mit 0,02 m Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,4) gleichmäßig durchfeuchtet und anschließend werden die zu untersuchenden Substanzen in 10 μ l wäßriger Lösung (ca. 1-5 mg/ml) auf je 3-4 cm in der Plattenmitte rasch aufgetragen. Die Laufzeit beträgt 1,5 Std. bei einer Stromstärke von 12 mA.

3) Hydrolyse mit Salzsäure (69)

Aus 1 mg Trockenrückstand der FOLCH-Oberphase aus den Nieren von Tieren mit 30 Min. Überlebenszeit (entsprechend 184266 DpM) wurde die radioaktive Substanz X durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem III gereinigt. Anschließend wurde ein Drittel der isolierten Substanz (61422 DpM) im Laufmittelsystem III radiodünnschichtchromatographisch analysiert, der verbleibende Rest (122844 DpM) wurde mit 3 ml 2 n Salzsäure 8 Std. rückflußgekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung über Nacht über Kaliumhydroxid in einem halbevakuierten Exsikkator gehalten und anschließend gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 0,05 ml Wasser aufgenommen und im Laufmittelsystem III radiodünnschichtchromatographisch untersucht.

Im Kontrollversuch wurden 384 ng (ca. $5,2 \times 10^6$ DpM) 3-Desoxygalaktose-[3,4- ^3H] der gleichen Behandlung unterzogen.

4) Säulenchromatographische Isolierung (87)

53,8 mg Trockenrückstand der FOLCH-Oberphase des Gehirnlipidextraktes der Tiere aus Gruppe IV werden in 1,5 ml Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 25 : 4 (Vol./Vol./Vol.) unter leichtem Erwärmen gelöst und auf eine Kieselgel G-Säule (Kieselgel G nach STAHL für die Dünnschichtchromatographie; Merck-Nr. 7731) (1 x 19,1 cm, Säulenvolumen 15,0 ml), die mit Chloroform/Methanol 9:1 (Vol./Vol.) äquilibriert wurde, aufgebracht. Die Säule wird nacheinander mit 60 ml Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 25 : 4 und 100 ml Chloroform/Methanol/Wasser 60 : 32 : 7 eluiert, und das Eluat wird in 130 Fraktionen zu je 1,15 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Gilson Microcol TDC 80) eingeteilt. Die dünnschichtchromatographische Überprüfung der Fraktionen im Laufmittelsystem III mit Referenzsubstanzen erbringt nach Anfärbung mit dem Reagenz nach KÄGI-MIESCHER folgende Substanzverteilung:

Fraktion 1 - 15: leer

- " 16 - 48: kontaminierende Lipide wie freie Fettsäuren, wenig Kerasin und Cerebron sowie zwei Substanzen mit den R_f -Werten 0,39 (ocker) und 0,61 (gelb)
- " 49 - 58: leer
- " 59 - 63: eine Substanz mit $R_f = 0,78$ (violett) und die gesuchte Substanz X ($R_f = 0,30$; grauviolett)
- " 64 - 72: wenig Substanz mit $R_f = 0,40$ (grün) und die gesuchte Substanz X
- " 73 - 79: Gangliosid $G_{M1}^{1)}$ ($R_f = 0,24$; grün) und die gesuchte Substanz X
- " 80 - 86: wenig Substanz mit dem R_f -Wert 0,47 (violett) und Substanz X
- " 87 - 96: Gangliosid $G_{M1}^{1)}$, die Substanz mit dem R_f -Wert 0,47 und abnehmend Substanz X
- " 97 - 99: Ganglioside $G_{M1}^{1)}$ und $G_{D1a}^{1)}$ sowie die Substanz mit $R_f = 0,47$ (violett)
- " 100 - 103: Gangliosid $G_{D1a}^{1)}$ und andere Ganglioside
- " 104, 105: Gangliosid $G_{T1}^{1)}$
- " 106 - 130: leer

Die Fraktionen 58 - 88 werden vereinigt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt.

Der über P_2O_5 getrocknete Rückstand wird in 1 ml Chloroform/Methanol 9:1 (Vol./Vol.) gelöst und auf eine mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch äquilibrierte Kieselgel G-Säule (Merck-Nr. 7731) (1 x 12 cm, Säulenvolumen 9,42 ml) aufgetragen. Als Elutionsmittel werden nacheinander die Chloroform/Methanol/Wasser-Gemische 70 : 30 : 3 (15 ml), 65 : 25 : 4 (30 ml) und 60 : 32 : 7 (15 ml) benutzt. Das Eluat wird in 160 Fraktionen zu je 0,3 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Gilson Microcol TDC 80) aufgefangen. Nach der dünnschichtchromatographischen Analyse der Fraktionen im Laufmittelsystem III (Anfärbung mit KÄGI-MIESCHER's Reagenz) zeigt sich folgende Substanzverteilung:

¹⁾ Nomenklatur der Ganglioside nach SVENNERHOLM (90), s. auch unter Abkürzungen.

Fraktion	1 - 60:	leer
"	61 - 62:	eine Substanz mit $R_f = 0,18$ (violett) und Substanz X
"	63 - 82:	einheitlich die gesuchte Substanz X
"	83 - 84:	leer
"	85 - 89:	Gangliosid G_{M1} ($R_f = 0,24$; grün)
"	90 - 101:	leer
"	102:	Spur Substanz mit $R_f = 0,47$ (violett)
"	103 - 119:	leer
"	120 - 127:	Spur Substanz mit $R_f = 0,47$ (violett)
"	128 - 139:	leer
"	140 - 148:	wenig Substanz mit einem R_f -Wert von 0,40 (grün)
"	149 - 160:	leer

Die Fraktionen 64 - 82 werden vereinigt und im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. Nach dem Trocknen über P_2O_5 im Vakuum wird das Gewicht des Rückstandes zu 1,02 mg bestimmt.

5) Gaschromatographie

50 μg über P_2O_5 getrocknete Substanz werden in einem 0,3 ml-Schliffzentrifugenglas in 6 μl abs. Pyridin aufgenommen und mit je 2 μl Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in das Trimethylsilylderivat überführt (s. Abschnitt D 4).

3,9 μl entsprechend 19,5 μg Substanzmenge werden in den Gaschromatographen eingespritzt und unter den im Abschnitt D 4 angegebenen Bedingungen analysiert. Um die Probenlösung vollständig zu injizieren, wird vor der Probe 1 μl Benzol aufgezogen.

7) Synthese von 3-Desoxy-D-dulcit (modifiziert nach 46)

10 mg (60,92 μMol 3-Desoxy-D-galaktose werden in 0,1 ml Wasser gelöst und bei 0 °C mit 5 mg (132,2 μMol) festem Natriumborhydrid (Merck-Schuchardt-Nr. 806373) versetzt. Man nimmt das Reaktionsgefäß aus dem Eisbad und schüttelt 30 Min. bei Raumtemperatur, wobei man das Schütteln mehrmals unterbricht und den Deckel des Reaktionsgefäßes öffnet, um den gebildeten Wasserstoff entweichen

zu lassen. Danach wird die Lösung mit 0,4 ml Wasser verdünnt und saurer Ionenaustauscher AG 50 WX 4, 50-100 mesh (Fa. Bio-Rad Lab., München) hinzugefügt, bis ein pH-Wert von etwa 4 erreicht ist. Wenn die Gasentwicklung beendet ist, wird der Austauscher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht. Der farblose Rückstand wird zum Entfernen der Forsäure dreimal in je 20 ml Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel jeweils im Rotationsverdampfer entfernt. Die gewonnene Substanz wird über P_2O_5 getrocknet und ausgewogen. Die Ausbeute beträgt 7,9 mg entsprechend 78,1 % d.Th. In mehreren Ansätzen konnten Ausbeuten zwischen 77,5 und 99,5 % d.Th. erzielt werden.

Gaschromatographischer Vergleich von synthetischem 3-Desoxydulcit und radioaktiver Substanz X:

2,5 mg Trockenrückstand der FOLCH-Oberphase (entsprechend ca. 10^6 DpM) aus den Nieren von Tieren mit 60 Min. Überlebenszeit wurden in 0,4 ml Chloroform/Methanol 2:1 gelöst, auf zwei DC-Plastikfolien Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator; Schichtdicke 0,2 mm; Merck-Nr. 5748) aufgetragen und im Laufmittelsystem IV chromatographiert. Nach der radiodünnschichtchromatographischen Analyse wurden die radioaktive Substanz X enthaltenden Teile der Folien ausgeschnitten und anschließend die Substanz mit Methanol/Wasser 1:1 (Vol./Vol.) daraus absteigend eluiert. Im Eluat von 5,5 ml wurden 2,65 mg D-Dulcit und 2,25 mg 3-Desoxy-D-dulcit gelöst und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wurde einige Std. über P_2O_5 getrocknet, in 30 μ l abs. Pyridin aufgenommen, durch Zugabe von je 10 μ l Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan trimethylsilyliert und gaschromatographiert.

Das erhaltene Gaschromatogramm zeigte jedoch auch bei hoher Verstärkung nur sehr kleine Gipfel der Zuckeralkohole. Der Grund dafür dürfte in der Bindung der Hexite an die aus der Kieselgelfolie miteluierten Kieselsäure liegen.

Der bei der Trimethylsilylierungsreaktion erhaltene Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und verworfen. Um das Desoxydulcit von

der Kieselsäure zu verdrängen, wurden dem Rückstand 2,80 mg D-Dulcit zugefügt und das Gemisch 30 Min. mit 1 ml erwärmtem abs. Pyridin geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand im Stickstoffstrom eingedampft und erneut trimethylsilyliert (15 µl abs. Pyridin, 5 µl Hexamethyldisilazan und 5 µl Trimethylchlorsilan). Nach dem Abzentrifugieren wurden 5 µl des Überstandes in den Gaschromatographen eingespritzt.

Zu IV) Enzymatische Untersuchungen mit 3-Desoxy-D-galaktose

Enzymkinetische Messungen mit Galaktokinase und Hexokinase wurden im zusammengesetzten optischen Test in einem PMQ III-Spektrophotometer der Fa. Carl Zeiß (Oberkochen) durchgeführt.

1) Galaktokinase aus Hefe

(ATP: D-Galaktose 1-Phosphotransferase, EC 2.7.1.6)

Definition der Einheit: 1 Einheit ist diejenige Enzymmenge, die bei pH 7,0 und 25 °C 1 µMol D-Galaktose in Galaktose-1-phosphat pro Minute umwandelt.

Der optische Test wird in temperierbaren 3 ml-Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C durchgeführt, die Messungen erfolgen bei 340 nm jeweils gegen eine Vergleichsküvette ohne NADH und ohne Substrat. Die Reaktion wird 10-30 Min. verfolgt, wobei die Extinktion in den ersten 5 Min. alle 30 Sek., dann jede Minute abgelesen wird.

Gestartet wird die Reaktion nach einer Äquilibrierungszeit der Indikatorsysteme (5 Min.) durch Zugabe von 0,1 ml Enzymlösung.

Lösungen:

A: 0,1 m Triäthanolamin-Puffer/Cysteiniumchlorid-Lösung pH 7,6
1,86 g Triäthanolaminhydrochlorid und 105,4 mg L(+)-Cysteiniumchlorid (Monohydrat; Merck-Nr. 2839) werden in ca. 90 ml aq. bidest. gelöst, mit 1 n Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt und mit aq. bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Die Lösung A wird alle 2-3 Tage frisch hergestellt, da sich ein Niederschlag bildet.

B: PEP/KCl-Lösung

124,1 mg Phosphoenolpyruvat (PEP) und 497,1 mg Kaliumchlorid werden mit 0,1 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,6 auf 10 ml aufgefüllt.

C: NADH-Lösung

35,5 mg reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid (β -NADH) werden mit 0,1 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,6 auf 5 ml aufgefüllt.

D: Lactat-Dehydrogenase

L-Lactat: NAD^+ Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27) aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension in 3,2 m Ammoniumsulfatlösung (5 mg/ml), spezifische Aktivität ca. 450 U/mg.

E: Pyruvatkinase

ATP: Pyruvat Phosphotransferase (EC 2.7.1.40) aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension in 3,2 m Ammoniumsulfatlösung (2 mg/ml), spezifische Aktivität ca. 150 U/mg.

F: ATP/ MgCl_2 -Lösung

100,9 mg Adenosintriphosphat (ATP) und 33,9 mg Magnesiumchlorid-hexahydrat werden mit 0,1 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,6 auf 5 ml aufgefüllt.

G: Galaktokinase aus Hefe (*Kluyveromyces fragilis*)

Da das Enzym gegen wiederholtes Einfrieren und Auftauen empfindlich ist (88), werden 20 Einheiten lyophilisierte Galaktokinase entsprechend 0,7 mg Protein (spezifische Aktivität ca. 30 U/mg) in 5 ml eiskalter Lösung A gelöst, in 20 aliquote Portionen zu je 0,25 ml aufgeteilt und in Eppendorf-Gefäßen bei -20°C gelagert. Die benötigte Galaktokinase wird jeweils kurz vor der Messung aufgetaut. Längere Lagerungszeiten sind jedoch wegen der Instabilität des Enzyms zu vermeiden (88 und eigene Beobachtungen).

Tab. 12. Standard-Testansatz zur Messung von Zeit-Umsatz-Kurven der Galaktokinasereaktion.

	Volumina	Konzentration in der Testmischung
O,1 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,6	2,50 ml	100 mM
L-Cysteiniumchlorid		5 mM
Phosphoenolpyruvat	0,15 ml	1,33 mM
Kaliumchlorid		33,33 mM
β -NADH	0,05 ml	0,167 mM
Lactat-Dehydrogenase	0,02 ml	ca. 15 U/ml
Pyruvatkinase	0,02 ml	ca. 2 U/ml
Adenosintriphosphat	0,06 ml	0,67 mM
Magnesiumchloridhexahydrat		0,67 mM
Substrat	0,10 ml	variabel
Galaktokinase	0,10 ml	ca. 0,13 U/ml

2) Hexokinase aus Hefe

(ATP: D-Hexose 6-Phosphotransferase, EC 2.7.1.1)

Die kinetischen Messungen wurden wie ausführlich beschrieben (89) durchgeführt.

Tab. 13. Standard-Testansatz zur Messung von Zeit-Umsatz-Kurven der Hexokinasereaktion.

	Volumina	Konzentration in der Testmischung
O,1 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,6	1,27 ml	42 mM
Substrat	1,20 ml	variabel
Magnesiumchloridhexahydrat	0,20 ml	6,7 mM
Adenosintriphosphat	0,10 ml	2,7 mM
NADP ⁺	0,20 ml	0,73 mM
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0,01 ml	0,50 U/ml
Hexokinase	0,02 ml	ca. 0,05 U/ml

E) ZUSAMMENFASSUNG

1.) Unmarkierte 3-Desoxy-D-galaktose zeigte in zwei Fütterungsversuchen über einen Zeitraum von vierzehn Tagen an sechzehn Tage alten Ratten in einer Dosis von etwa 10 g pro kg Körpergewicht keine toxische Wirkung. Die Tiere entwickelten sich parallel zu denen der Vergleichsgruppen.

2.) In gangliosidfreien Gehirnlipidextrakten waren nach Verfütterung der unmarkierten Substanz keine signifikanten Veränderungen von Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppen nachweisbar. Auch nach intraperitonealer und intracerebraler Injektion von 3-Desoxy-D-galaktose-[3,4-³H] konnte kein Einbau der Substanz in galaktosehaltige Lipide des Gehirns gefunden werden.

3.) Nach Chloroform/Methanol-Extraktion und "FOLCH-Verteilung" der Gehirne der mit 3-Desoxy-D-galaktose gefütterten Tiere enthielt die (hydrophile) Oberphase außer den Gangliosiden eine zusätzliche, in den Kontrolltieren nicht nachweisbare Substanz.

4.) Die unter 3.) erwähnte Substanz konnte säulenchromatographisch isoliert und näher charakterisiert werden. Sie erwies sich dünnschicht- und gaschromatographisch sowie beim Vergleich der Massen- und NMR-Spektren identisch mit synthetischem 3-Desoxy-D-galaktit (3-Desoxy-D-dulcit).

5.) Die Verteilung der nach Vorversuchen intraperitoneal injizierten tritiierten 3-Desoxy-D-galaktose wurde pharmakokinetisch in Gehirn, Leber, Niere, Magen und Blut verfolgt.

6.) Nach intraperitonealer Injektion von radioaktiver 3-Desoxy-D-galaktose konnte in Chloroform/Methanol-Extrakten aus Niere nur 3-Desoxy-D-galaktit, in Extrakten aus Leber 3-Desoxy-D-galaktose und ein weiterer markierter Metabolit, der sich dünnschichtchromatographisch und dünnschichtelektrophoretisch wie 3-Desoxy-D-

galaktonsäure verhielt, nachgewiesen werden.

7.) Die nicht mit Chloroform/Methanol extrahierbare Radioaktivität im Organrückstand ist offenbar in ein komplexes Molekül eingebaut. Sie ließ sich durch salzsaure Hydrolyse freisetzen und erbrachte eine Substanz, die ebenfalls den gleichen R_F -Wert wie 3-Desoxy-D-galaktonsäure besaß.

8.) Die Radioaktivitätsverteilung in den vier Hauptzellunterfraktionen der Leber wurde nach intraperitonealer Gabe von markierter 3-Desoxy-D-galaktose und 60 Minuten Überlebenszeit der Tiere untersucht.

9.) Die in der löslichen Fraktion enthaltene Radioaktivität konnte mit Hilfe der Gelchromatographie in zwei Fraktionen mit Molekulargewichten von etwa 200 und 2 000 aufgetrennt werden.

Die durch salzsaure Hydrolyse der löslichen Fraktion erhaltene Substanz zeigte das gleiche dünnsschichtchromatographische Verhalten wie die unter 7.) erwähnte.

10.) Mit Galaktokinase aus Hefe wurde die Substrateigenschaft der 3-Desoxy-D-galaktose (neben D-Galaktose und 2-Desoxy-D-galaktose) für dieses Enzym bestimmt.

F) LITERATURVERZEICHNIS

- (1) YAMAKAWA, T., KISO, N., HANDA, S., MAKITA, A., YOKOYAMA, S.,
J. Biochem. (Tokyo) 52, 226 (1962).
- (2) STOFFYN, P. und STOFFYN, A.,
Biochim. Biophys. Acta 70, 218 (1963).
- (3) WIEGANDT, H., Angew. Chem. 80, 89 (1968).
- (4) SANDHOFF, K., Angew. Chem. 89, 283 (1977).
- (5) JATZKEWITZ, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
311, 279 (1958); 318, 265 (1960); 320, 134 (1960).
- (6) AUSTIN, J.H., BALASUBRAMANIAN, A.S., PATTABIRAMAN, T.N.,
SARASWATHI, S., BASU, D.K. und BACHHAWAT, B.K.,
J. Neurochem. 10, 805 (1963).
- (7) JATZKEWITZ, H. und SANDHOFF, K.,
Biochim. Biophys. Acta 70, 354 (1963).
- (8) SUZUKI, K. und CHEN, G.R., J. Lipid Res. 8, 105 (1967).
- (9) VAN HOOF, F. in: H.G. HERS und F. VAN HOOF, Lysosomes and
Storage Diseases, S. 305 f., Academic Press, New York 1973.
- (10) SVENNERHOLM, L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 436 (1962).
- (11) OKADA, S. und O'BRIEN, J.S., Science 165, 698 (1969).
- (12) SANDHOFF, K., FEBS Letters 4, 351 (1969).
- (13) SANDHOFF, K., ANDREAE, U. und JATZKEWITZ, H.,
Pathol. Eur. 3, 278 (1968).
- (14) OKADA, S., McCREA, M. und O'BRIEN, J.S.,
Pediatr. Res. 6, 606 (1972).
- (15) ISHIZUKA, I., SUZUKI, M. und YAMAKAWA, T.,
J. Biochem. (Tokyo) 73, 77 (1973).
- (16) KEPPLER, D.O.R. und HÜBNER, G.,
Exp. Mol. Pathol. 19, 365 (1973).
- (17) SMITH, D.F. und KEPPLER, D.O.R.,
Eur. J. Biochem. 73, 83 (1977).
- (18) BARNETT, J.E.G. und MUNDAY, K.A. in: W.L. BURLAND und P.D.
SAMUEL, Transport across the intestine, S. 111, Glaxo Sym-
posium 1971, London 1972.
- (19) KLEINZELLER, A. und McAVOY, E.M.,
Biochim. Biophys. Acta 455, 126 (1976).
- (20) WALLENFELS, K. und KURZ, G., Biochem. Z. 335, 559 (1962).
- (21) DeLEY, S. und DOUDOROFF, M., J. biol. Chem. 227, 745 (1957).
- (22) WENGENMAYER, F., UEBERSCHÄR, K.-H., KURZ, G. und SUND, H.,
Eur. J. Biochem. 40, 49 (1973).

- (23) SCHIWARA, H.W. und DOMACK, G.F., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1321 (1968) und frühere Mitteilungen.
- (24) WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., FROMME, I. und JOSEPH, N., Angew. Chem. 65, 555 (1953).
- (25) WEYGAND, F. und WOLZ, H., Chem. Ber. 85, 256 (1952).
- (26) GRUBER, ST., Diplomarbeit, Universität München 1973.
- (27) "Galaktosämie, Galaktokinase-Mangel, Laktose-Intoleranzen, Kuhmilchallergie" erschienen in der Reihe "Monographien über Stoffwechselstörungen im Kindesalter", Herausgeber Deutsche Maizena Werke GmbH, Hamburg 1969/70.
- (28) KOLB, E. in: H.M. RAUEN, Biochemisches Taschenbuch, Bd. 2, S. 372, Springer-Verlag, Berlin 1964.
- (29) BENJAMINS, J.A. und McKHANN, G.M. in: G.J. SIEGEL, R.W. ALBERS, R. KATZMAN und B.W. AGRANOFF, Basic Neurochemistry, 2nd Ed., S. 370 f., Little, Brown & Company, Boston 1976.
- (30) KNULL, H.R., LOBERT, P.F. und WELLS, W.W., Brain Res. 79, 524 (1974).
- (31) RIGDON, R.H., COUCH, J.R., CREGER, C.R. und FERGUSON, T.M., Experientia 19, 349 (1963).
- (32) KNULL, H.R. und WELLS, W.W., J. Neurochem. 20, 415 (1973).
- (33) KINOSHITA, J.H. in: H.L. SIPPLE und K.W. McNUTT, Sugars in Nutrition, S. 375 ff., Academic Press, New York 1974.
- (34) PALLASKE, G. und KRAHNERT, R. in: P. COHRS, R. JAFFÉ und H. MEESSEN, Pathologie der Laboratoriumstiere, Bd. II, S. 12 f., Springer-Verlag, Berlin 1964.
- (35) FOLCH, J., LEES, M. und SLOANE-STANLEY, G.H., J. biol. Chem. 226, 497 (1957).
- (36) WILLIAMS, H.H., GALBRAITH, H., KAUCHER, M., MOYER, E.Z., RICHARDS, A.J., MACY, I.G., J. biol. Chem. 161, 475 (1946).
- (37) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, S. 3, E. Merck AG, Darmstadt 1965.
- (38) DUVE, C. de, PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. und APPELMANS, F., Biochem. J. 60, 604 (1955).
- (39) SAWANT, P.L., SHIBKO, S., KUMTA, U.S. und TAPPEL, A.L., Biochim. Biophys. Acta 85, 82 (1964).
- (40) SCOTT, J.E. in: D. GLICK, Methods of Biochemical Analysis, Bd. 8, S. 145 ff., Interscience Publishers, New York 1960.
- (41) HANES, C.S. und ISHERWOOD, F.A., Nature 164, 1107 (1949).
- (42) KREBS, K.G., HEUSSER, D. und WIMMER, H. in: E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., S. 816, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- (43) ibido, S. 834 f.
- (44) SWEELEY, C.C., BENTLEY, R., MAKITA, M. und WELLS, W.W., J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963).

- (45) LÖNNGREN, J. und SVENSSON, S.,
Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 29, 41 (1974).
- (46) LAINE, R.A., ESSELMAN, W.J. und SWEeley, C.C. in: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. 28, Teil B, (Hrsg. V. GINSBURG), S. 161, Academic Press, New York 1972.
- (47) LELOIR, F., Arch. Biochem. Biophys. 33, 186 (1951).
- (48) BALLARD, F.J., Biochem. J. 98, 347 (1966).
- (49) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W., Biochem. Z. 286, 81 (1936).
- (50) LINEWEAVER, H. und BURK, D.,
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
- (51) THOMAS, P., BESELL, E.M. und WESTWOOD, J.H.,
Biochem. J. 139, 661 (1974).
- (52) HEINRICH, M.R., J. biol. Chem. 239, 50 (1964).
- (53) ALVARADO, F., Biochim. Biophys. Acta 41, 233 (1960).
- (54) COHN, R.S. und SEGAL, S., Metabolism 22, 627 (1973).
- (55) KALCKAR, H.M., ANDERSON, E.P. und ISSELBACHER, K.J.,
Biochim. Biophys. Acta 20, 262 (1956).
- (56) GABBAY, K.H. und KINOSHITA, J.H. in: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. 41, Teil B, (Hrsg. W.A. WOOD), S. 159 ff., Academic Press, New York-San Francisco-London 1975.
- (57) GITZELMANN, R., Pediatr. Res. 1, 14 (1967).
- (58) WALKER, D.G. und KHAN, H.H., Biochem. J. 108, 169 (1968).
- (59) ATTWOOD, M.A. und DOUGHTY, C.C.,
Biochim. Biophys. Acta 370, 358 (1974).
- (60) MOONSAMMY, G.I. und STEWART, M.A.,
J. Neurochem. 14, 1187 (1967).
- (61) CLEMENTS jr., R.S., WEAVER, J.P. und WINEGRAD, A.I.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 347 (1969).
- (62) HAYMAN, S. und KINOSHITA, J.H.,
J. biol. Chem. 240, 877 (1965).
- (63) FISCHER, W. und WEINLAND, H., Stoffwechsel der Galaktose und ihrer Derivate, S. 122, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1965.
- (64) QUAN-MA, R. und WELLS, W.W.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 486 (1965).
- (65) GLASGOW, M.S. und QUARLES, R.H.,
Biochim. Biophys. Acta 304, 586 (1973).
- (66) VETTER, H. und VEALL, N., Radioisotopentechnik in der klinischen Forschung und Diagnostik, S. 174, Urban & Schwarzenberger Verlag, München-Berlin 1960.
- (67) JATZKEWITZ, H.,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 326, 61 (1961).

- (68) MANGOLD, H.K. und TUNA, N., Fed. Proc. 20, 268 (1961).
- (69) SANDHOFF, K., HARZER, K., WÄSSLE, W. und JATZKEWITZ, H., J. Neurochem. 18, 2469 (1971).
- (70) ADACHI, S., J. Chromatogr. 17, 295 (1965).
- (71) SUZUKI, K., J. Neurochem. 12, 969 (1965).
- (72) SANDHOFF, K., Dissertation, Universität München 1965.
- (73) JATZKEWITZ, H., PILZ, H. und SANDHOFF, K., J. Neurochem. 12, 135 (1965).
- (74) STAHL, E. und KALTENBACH, U., J. Chromatogr. 5, 351 (1961).
- (75) SNYDER, F. und STEPHENS, N., Anal. Biochem. 4, 128 (1962).
- (76) SCHRAVEN, J., CAP, C., NOWOCZEK, G. und SANDHOFF, K., Anal. Biochem. 78, 333 (1977).
- (77) ibido (42), S. 839.
- (78) WEICKER, H. und BROSSMER, R., Klin. Wchschr. 39, 1265 (1961).
- (79) SIMON, H., MUELLHOFFER, G. und MEDINA, R. in: Radioisotope sample measurement techniques in medicine and biology, S. 317, International Atomic Energy Agency, Vienna 1965.
- (80) ROMEIS, B., Mikroskopische Technik, S. 155 ff., 15. Auflage, Leibniz-Verlag, München 1948.
- (81) FOLCH, J., ASCOLI, I., LEES, M., MEATH, J.A. und LeBARON, F.N., J. biol. Chem. 191, 833 (1951).
- (82) MEHL, E. und JATZKEWITZ, H., Naturwiss. 50, 227 (1963).
- (83) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J., J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- (84) Katalog Fa. Bio-Rad Lab., München 1969.
- (85) ISBELL, H.S. in: R.L. WHISTLER und M.L. WOLFROM, Methods in Carbohydrate Chemistry, Bd. II, S. 13 f., Academic Press, New York-London 1963.
- (86) Biochemica Information II, S. 72, Boehringer Mannheim 1975.
- (87) SVENNERHOLM, L. in: R.L. WHISTLER und M.L. WOLFROM, Methods in Carbohydrate Chemistry, Bd. VI, S. 464 ff., Academic Press, New York 1970.
- (88) HEINRICH, M.R. und HOWARD, S.M. in: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. 9 (Hrsg. W.A. WOOD), S. 407 ff., Academic Press, New York-London 1966.
- (89) Biochemica Information I, S. 113, Boehringer Mannheim 1973.
- (90) SVENNERHOLM, L., J. Neurochem. 10, 613 (1963).
- (91) SANDHOFF, K. und PALLMANN, B., Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 122 (1978).

G) LEBENSLAUF

Am 5. August 1947 wurde ich, Stephan Otto Gruber, in München geboren. Meine Eltern sind Elisabeth und Hugo Gruber, Beamter im Ruhestand.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Gabelsberger-Volksschule in München, von 1957 an das Rupprecht-Gymnasium in München, an dem ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, an der ich im Wintersemester 1968/69 die Diplomvorprüfung und im April 1971 die Diplomhauptprüfung bestand.

Die Diplomarbeit mit dem Thema: "Synthese von unmarkierter und mit Tritium markierter 3-Desoxy-D-galaktose zur gezielten Störung im Stoffwechsel" fertigte ich von Juli 1971 bis Dezember 1971 und von Juli 1972 bis Dezember 1972 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie an, wo auch in der Zeit von Januar bis Juni 1972 und von März 1973 bis Mai 1976 die vorliegende Doktorarbeit unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. B. Linzen und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz entstand.

